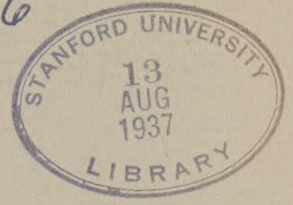


E. C. H. J. NOYONS - CHEMISCHE EN MEDISCHE
ONDERZOEKINGEN
OVER CHOLESTEROL

THESIS

AMSTERDAM

1936





Digitized by the Internet Archive
in 2026

CHEMISCHE EN MEDISCHE ONDERZOEKINGEN
OVER CHOLESTEROL

CHEMISCHE EN MEDISCHE ONDERZOEKINGEN OVER CHOLESTEROL

PROEFSCHRIFT TER VERKRIJGING VAN DE
GRAAD VAN DOCTOR IN DE WIS- EN NATUUR-
KUNDE AAN DE UNIVERSITEIT VAN AMSTER-
DAM, OP GEZAG VAN DEN RECTOR-MAGNIFICUS
DR E. LAQUEUR, HOOGLERAAR IN DE FACULTEIT
DER GENEESKUNDE, IN HET OPENBAAR TE VER-
DEDIGEN IN DE AULA DER UNIVERSITEIT OP
WOENSDAG 7 OCTOBER 1936 DES NAMIDDAGS
TE 4½ UUR, DOOR

EDUARDUS CHRISTIANUS HENRICUS JOHANNES NOYONS

GEBOREN TE UTRECHT

H. J. PARIS
AMSTERDAM — MCMXXXVI

Ja

518515

AAN MIJN VROUW
AAN MIJN KINDEREN

Nu dit proefschrift beëindigd is, reken ik het mij niet alleen tot een plicht, doch ook tot een groot genoegen om bij deze welkome gelegenheid U, Hoogleraren aan deze Universiteit en oud-Hoogleraren in de Faculteit der Wis- en Natuurkunde te Utrecht, mijn oprechte dankbaarheid te betuigen.

Op de allereerste plaats gaat mijn dank uit tot U, Hooggeleerde SNAPPER, Hooggeachte Promotor. Toen ik een paar jaar geleden tot U kwam met de vraag mij een onderwerp tot physiologisch-chemisch onderzoek te willen verschaffen, om mijn zin tot wetenschappelijk werken te kunnen bevredigen, verklaardet Gij U aanstonds hiertoe bereid en, na Uw keuze bepaald te hebben, spraakt Gij als uw overtuiging uit, dat dit onderwerp tevens zou kunnen dienen tot het verwerven van de doctorstitel.

Door prettige omstandigheden daartoe gebracht, had ik mij de laatste tijd meer en meer bewogen op medisch-chemisch terrein, om welke reden ik mij tot U, Hooggeleerde SNAPPER, wendde om een desbetreffend onderzoek te kunnen aanvangen. Indien Gij mij niet zo spontaan met Uw raad hadt bijgestaan, zou het waarschijnlijk niet tot het bewerken van deze dissertatie zijn gekomen.

Ik druk U dan ook mijn oprechte erkentelijkheid uit voor uw grote bereidwilligheid en voor de vele hulp en raad, die ik bij de bewerking van dit proefschrift van U mocht ontvangen.

Hooggeleerde KRUYT, ook U dank ik voor Uw zo paedagogische colleges, waaruit niet alleen uw grote kennis en ervaring sprak, doch waarin Gij U tevens openbaardet als een nauwgezet, critisch onderzoeker en een vriend van uw leerlingen, zoals ik bij menige gelegenheid persoonlijk heb mogen ondervinden.

Hooggeleerde COHEN, prettige herinneringen bewaar ik nog aan de tijd, dat ik onder Uw leiding op het van 't Hoff-Laboratorium heb mogen werken; uw welsprekendheid en nauw-

keurige taalverzorging zijn ons, die bij het Middelbaar en Voorbereidend Hoger Onderwijs werkzaam zijn, ten voorbeeld.

Hooggeleerde VAN ROMBURGH, Uw heldere colleges, alsook de tijd, die ik op Uw laboratorium ben werkzaam geweest, zullen niet licht in mijn herinnering vervagen; de wijze, waarop Gij U in de laboratorium-uren met ons onderhieldt, waarop Gij met woord en daad en een zonnig optimisme ons, laboranten, ter hulp kwaamt, was ons in onze jonge jaren een steun de moed niet te verliezen en te trachten ons doel te bereiken.

Zeergeleerde MEUWISSEN en Zeergeleerde SLOOFF, ook U mijn welgemeende dank voor de belangstelling, die Gij mij bij de totstandkoming en de bewerking van dit proefschrift steeds hebt betoond.

De Zeer Eerw. Zusters van het R.K. Binnen-Ziekenhuis te Eindhoven ben ik ook grote dank verschuldigd voor Haar bereidwilligheid; alle onderzoekingen werden op het laboratorium van dit Ziekenhuis verricht en steeds heb ik van Haar de grootste tegemoetkoming mogen ondervinden.

Mej. M. HOPPENBROUWERS, ook U mag ik mijn erkentelijkheid niet onthouden voor de vele en uitstekende hulp, die Gij mij bij mijn onderzoek hebt willen verlenen.

Mijn grootste dank moet echter uitgaan naar iemand, naast mijn Ouders, die door Haar opoffering en onbaatzuchtigheid mijn universitaire studie heeft mogelijk gemaakt en aan wie ik ontzaglijk veel te danken heb; haar bescheidenheid verbiedt mij echter haar naam te noemen.

Tenslotte wil ik allen, Conservator Dr GRÜNBAUM in het bijzonder, die direct of indirect aan de totstandkoming van mijn dissertatie hebben medegewerkt, hartelijk dankzeggen voor hun goede zorgen.

INHOUD.

1E DEEL

	Bldz.
HOOFDSTUK I - OVER DE CHEMISCHE EN PHYSIOLOGISCHE EIGENSCHAPPEN VAN CHOLESTEROL	3
HOOFDSTUK II - OVER DE BEPALING VAN CHOLESTEROL (VRIJ EN VERESTERD) IN MENSELIJK SERUM OF PLASMA VOLGENS VERSCHILLENDE METHODES	14
A - De colorimetrische bepaling van cholesterol.	
§ 1 - Kleurreacties op cholesterol	14
§ 2 - De reactie van Liebermann-Burchard	15
§ 3 - Toepassing van andere kleurreacties	17
§ 4 - Is de colorimetrische bepaling in het algemeen betrouwbaar te achten?	18
B - De gravimetrische bepaling van cholesterol.	
§ 1 - Welke gravimetrische methodes geeft de literatuur?	27
§ 2 - Over de oplosbaarheid van het cholesterol-digitonide	31
C - De oxydimetrische bepaling van cholesterol.	
§ 1 - De natte oxydatie van organische verbindingen, in zonderheid van cholesterol	37
§ 2 - Opmerkingen over de oxydimetrische bepaling van choldig	40
§ 3 - Voorschrift voor een bepaling van vrij- en totaal cholesterol	43
D - De nephelometrische bepaling van cholesterol	54

	Bldz.
E - De bepaling van cholesterol door middel van een digitoninemethode langs indirecte weg	56
§ 1 - Voorschrift voor een cholesterolbepaling in serum volgens een aftrekmethode	56
§ 2 - Kan choldig zelf ook gehydrolyseerd worden? . . .	63
§ 3 - Voorschrift voor een cholesterolbepaling in serum door directe hydrolyse van choldig	72
HOOFDSTUK III - OVER DE EXTRACTIE VAN VRIJ- EN VERESTERD CHOLESTEROL UIT BLOEDSERUM . . .	78
§ 1 - Extractie der lipoïden na droging van het bloed (plasma of serum)	78
§ 2 - Directe extractie der lipoiden uit het bloed (plasma of serum)	80
HOOFDSTUK IV - OVER DE VERZEPING DER CHOLESTEROLESTERS IN BLOEDSERUM	84
§ 1 - Verzeping van de esters met loog	85
§ 2 - Verzeping van de esters met alcoholatoplossingen .	86
§ 3 - Bestendigheid van cholesterol bij de verzeping van zijn esters	87
§ 4 - Over de verzepingstijd der cholesterolsters	90
HOOFDSTUK V - OVER DIGITONINE	101
§ 1 - Over de formules en de zuiverheid van het digitonine	101
§ 2 - Over de additie van digitonine aan choldig . . .	106
Samenvatting	111

2E DEEL

HOOFDSTUK I - OVERZICHT OVER HET PROBLEEM VAN DE Z.G.N. ESTERSTURZ	115
HOOFDSTUK II - LOOPT DE REACTIE VAN TAKATA- ARA PARALLEL MET HET VERSCHIJNSEL VAN DE ESTER- STURZ?	135
Samenvatting	144

DEEL I

CHEMISCHE ONDERZOEKINGEN
OVER CHOLESTEROL

HOOFDSTUK I

OVER DE CHEMISCHE EN PHYSIOLOGISCHE EIGENSCHAPPEN VAN CHOLESTEROL

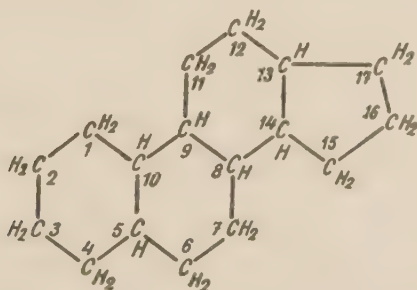
Cholesterol behoort tot een omvangrijke groep van in de levende natuur voorkomende verbindingen, die men veelal *lipoiden* noemt.

Deze lipoiden zijn stoffen, die in hun eigenschappen veel overeenkomst vertonen met de *vetten*, vooral wat betreft hun oplosbaarheid.

Door velen wordt de volgende indeling gegeven:

Wassen,
Phosphatiden,
Cerebrosiden,
Sterolen.

Onder *sterolen* in het algemeen verstaat men verbindingen met een hoog moleculair gewicht van de algemene formule $C_nH(2n-x)O$, waarin n groter is dan 20 en x kan variëren van 8-14; het zijn derivaten van cyclopentano-perhydro-phenantreen met een OH groep aan Catoom 3 en met 2 methylgroepen aan de Catomen 10 en 13; aan Catoom 17 dragen zij een alifatische zijketen. ^{o)}



Cyclo pentano-perhydro-phenantreen.

Vroeger werden vele andere stoffen tot de sterolen gerekend. „In het belang van een zuivere classificatie schijnt

het echter gewenst slechts die stoffen tot de sterolen te rekenen, die het bovenstaande koolstofskelet bezitten."

Voor al moet onderscheid gemaakt worden met de verwante polyterpenen; isocholesterol b.v. is geen sterol in boven-aangehaalde zin, maar een mengsel van twee stoffen met polyterpeenachtig karakter.^{o)}

Zoals de naam aanduidt, zijn de sterolen alcoholen, met een dubbele binding en een verzadigde ringstructuur; bovendien bezitten zij alle een iso-propylgroep, waardoor zij overeenkomst vertonen met de terpenen.

Door hun alcoholkarakter zijn zij in staat met zuren esters te vormen, terwijl ze in alcohol en aether oplosbaar zijn.

In alle cellen, zowel plantaardige als dierlijke, komen, naast vetten en andere lipoiden, sterolen voor. Men onderscheidt ze wel in

Zoösterolen en Phytosterolen.

Het voorkomen van sterolen in bacteriën is nog niet volkomen zeker bewezen.

Van de phytosterolen is het stigmasterol uit de Calabar-bonen het best onderzocht.

„Het sterol der hogere dieren, dat rijkelijk in de hersenen is opgehoopt, en zowel in gal, in galstenen en in andere weefsels aanwezig is, is het cholesterol; bij lagere dieren treft men isomeren van dit sterol aan."

„De phytosterolen gelijken buitengewoon veel op de dierlijke sterolen en werden daarom herhaaldelijk met deze verward, totdat WINDAUS een dieper inzicht in de constitutie van deze stoffen kon verwerven." ¹⁾ *)

Lange tijd werd aangenomen, dat alle dierlijke sterolen identiek waren; door latere onderzoekingen werd bekend, dat er niet één, maar verschillende zoösterolen bestonden.^{2, 3, 4, 5)}

Cholesterol heeft tot empirische formule: $C_{27}H_{46}O$.

Uit galstenen kan het door extractie met chloroform verkregen worden, terwijl het door omkristaliseren uit alcohol te zuiveren is. In water, zuren en basen is cholesterol on-

*) Deze cijfers verwijzen naar de achter elk Hoofdstuk vermelde Literatuur.

oplosbaar; uit watervrije oplosmiddelen scheidt het zich in naalden van een smeltpunt van $148,5^{\circ}$ (gecorr.) af, terwijl het uit verdunde alcohol in rhombische plaatjes kristalliseert met één molecule kristalwater. Het is optisch actief en wel links draaiend; in een aetherische oplossing is $[\alpha]_D = -31,12^{\circ}$.

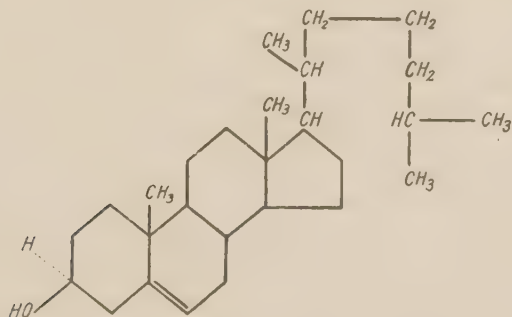
Cholesterol is gemakkelijk oplosbaar in zwavelkoolstof, pyridine, chloroform, benzol en aether; moeilijker lost het op in petroleumaether, aceton en koude alcohol.

Cholesterol kan sublimeren; in hoog-vacuüm destilleert het zonder te ontleden. De ruimtelijke bouw van het molecule is zeer gecompliceerd; deze werd echter door WINDAUS^{o)} in samenhang met het werk van WIELAND over de bouw van de met cholesterol zo nauw samenhangende galzuren, bijna volledig achterhaald.

De vetzure esters van cholesterol zijn aan hun dubbelbreking te herkennen^{o)}; de dubbele binding in het molecule kan met behulp van platinazwart door waterstof verzadigd worden, waardoor de alcohol β -cholestanol ontstaat; ook broom en ozon kunnen op deze plaats geaddeerd worden.

Wanneer cholesterol langere tijd aan licht en lucht wordt blootgesteld, ontstaat er een geclachtige verkleuring, die echter misschien aan het mede aanwezige ergosterol moet toegeschreven worden (SCHMITZ).

De waarschijnlijke, voorlopige formule, die uit samenvattende onderzoeken over het cholesterol volgt, is de hieronder staande:



Tot zover over de chemie en de physica van dit sterol.

OVER DE PHYSIOLOGIE VAN CHOLESTEROL

„Sterolen komen zo verspreid in allerlei biologische producten voor, dat men ze mag beschouwen als essentiële bestanddelen van het protoplasma” (VAN SLIJKE).

Waar komt cholesterol in het lichaam voor?

1 - In bloed.

De totale hoeveelheid cholesterol,^{7, 8)} wisselt onder normale omstandigheden in het menselijk serum volgens PETERS en VAN SLIJKE tussen

100 en 230 mgr per 100 cc.

Hiervan zijn 40-70 % veresterd.

Andere in de literatuur aangetroffen grenzen zijn:

140-200 mgr per 100 cc.,

waarvan 60 % in ester toestand aanwezig zou zijn.

RAPPAPORT.⁹⁾

GARDNER en GAINSBOROUGH.¹⁰⁾

CAMPBELL.¹¹⁾

BLOOR en KNUDSON.¹²⁾

POLANO onderzocht het plasma van 20 vrouwelijke en mannelijke studenten en vond de volgende getallen:

205 mgr % $\pm 41 \pm 9$;

hij nam deze waarden als normale hoeveelheden bij zijn onderzoek aan.

PETERSON en LEVINSON vonden bij 100 normalen de volgende grenzen:

160-245 mgr % in serum.

ROSEN en KRASNOW geven op als resultaat van een onderzoek bij 25 normale personen:

212 mgr % ± 18 in serum.

Over het esterpercentage later meer.

In de erythrocyten is zo goed als uitsluitend vrij cholesterol aanwezig; om deze reden kan men het best de cholesterol-fracties in serum of plasma bepalen. Zou men dit in totaal bloed doen, dan zouden de schommelingen in de hoeveelheid vrij cholesterol niet voldoende tot hun recht komen.

Normaal overweegt in menselijk bloedserum de veresterde hoeveelheid; de verhouding tussen beide fracties wordt veelal aangenomen als:

esterhoeveelheid: vrij cholesterol $\pm 2:1$.

(Zie later deel II).

Wanneer men alleen de verandering van de totale hoeveelheid cholesterol in het bloed op het oog heeft, kan men het volgende onderscheiden ⁹⁾:

Hypercholesterolaemie treft men aan bij:

- 1 - Lipoïdnephrose (steeds),
- 2 - Hypothyreose (idem),
- 3 - Zwangerschap (bijna steeds),
- 4 - Diabetes mellitus,
- 5 - Glomerulonephritis,
- 6 - Morbus Gaucher,
- 7 - Ziekte van Pick-Niemann,
- 8 - Arteriosklerose,
- 9 - Ziekte van Schüller-Christian,
- 10 - Levercirrhose.

Hypocholesterolaemie bij:

- Pernicieuse anaemie,
- Acute infectieziekten,
- Acute leveraandoeningen,
- Haemolytische icterus.

De hoeveelheid cholesterol, die in bloed wordt gevonden, blijkt, gezien de literatuur, sterk af te hangen van de gevolgde methodiek.

„Bij serie-onderzoek zal men zijn verkregen cijfers alleen mogen vergelijken met die van andere, welke volgens dezelfde methodiek verkregen zijn.” JORDANS ¹³⁾

Voornamelijk geldt dit m.i. voor de bepaling van de totale hoeveelheid; worden zowel vrij- als veresterd cholesterol bepaald en is bij de beoordeling *alleen* de verhouding van beide fracties van belang, dan is de bepalingswijze secundair. Meestal is de bepaling van het vrije- zowel als van het veresterde deel bij de gevolgde methode van overeenkomstige nauwkeurigheid, zodat de methodiek zelf betrekkelijk weinig invloed op het quotient uitoefenen zal.

2 - In de gal.

Cholesterol wordt regelmatig aangetroffen in de secretieproducten van het lichaam.

Gal bevat bij de mens uitsluitend vrij cholesterol, geen cholesterolesters. Gemiddeld wordt door de gal in 24 uur 0,075-0,23 gram cholesterol afgescheiden.¹⁴⁾ Alhoewel de cholesterolhoeveelheid in de gal evenals in het bloed verhoogd is, nadat cholesterolrijk voedsel is genuttigd¹⁵⁾, moet men in het gal-cholesterol toch waarschijnlijk nog wel iets anders zien dan een afvalproduct. Een bepaalde hoeveelheid hiervan wordt namelijk in de ingewanden weer geresorbeerd; toch kan de hoeveelheid cholesterol, door de faeces afgevoerd, de hoeveelheid, die in het voedsel aanwezig was, overtreffen.

Het moet voor een van de bestanddelen in de gal worden aangezien, die door hun eigenaardig emulgerend vermogen de vertering en de absorptie van vetten in de ingewanden kunnen bevorderen. (PETERS)

3 - In de urine.

Hierin komt cholesterol, volgens GROSS¹⁶⁾, bij normale personen niet voor, alhoewel GARDNER en GAINSBOROUGH¹⁷⁾ tot een andere conclusie komen; wel kan het aangetoond worden in de urine van vele patienten met lipoïdnephrose.

4 - In tumoren.

In twee types hiervan wordt cholesterol aangetroffen: n.l. in de cholesteatomateuse- en de xanthomateuse tumoren. De eerste gaan, zoals tot nu toe gebleken is, niet gepaard met hypercholesterolaemie, de laatste soms wel.

5 - In de bijnierschors.

Volgens ASCHOFF¹⁸⁾ en LANDAU¹⁹⁾ wordt cholesterol als normaal bestanddeel hierin aangetroffen, terwijl

6 - lever en hersenen

als een belangrijk depot van deze stof fungeren.

7 - In de afscheidingsproducten van de huid, ongeveer 0,108-0,216 gram per dag.

8 - In de wand der zieke bloedvaten bij arteriosklerose wordt cholesterol in meerdere of mindere mate gevonden.

Het aetherextract van de normale aorta bevat $\pm 25\%$ vrij-

en 13,8 % estercholesterol; het overeenkomstige extract van een arteriosklerotische aorta echter $\pm$ 22,5 % vrij- en 62,8 % veresterd cholesterol.

Cholesterolesters treft men abnormaal veel aan in organen, die aan vervetting lijden, zoals PANZER²⁰⁾ heeft aangetoond.

OVER DE STOFWISSELING VAN CHOLESTEROL

Cholesterol wordt, zoals door vele onderzoekers werd aangetoond, door de ingewanden geabsorbeerd.^{21, 22, 23, 24)}

Daar onafhankelijk van de vorm, waarin zich het cholesterol in het voedsel bevindt, de verhouding van vrij- en veresterd cholesterol in de chylus constant blijft, schijnt op de weg van het darmkanaal naar de lymphvaten hydrolyse en hernieuwde vorming van cholesterolesters plaats te vinden; de genoemde constante verhouding zou anders daar ter plaatse niet te verklaren zijn.

Het gelukte THANNHAUSER²⁵⁾ niet de splitsing van cholesterolesters met behulp van pancreassap of gal alleen door te voeren; hierbij moesten tegelijkertijd olie of vetzuren aanwezig zijn.

MINOVICI²⁶⁾ gelooft, dat de plantaardige sterolen de voornaamste bron zijn voor de synthese van cholesterol in het lichaam.

THANNHAUSER²⁷⁾ zegt, dat in tegenspraak met MINOVICI, SCHÖNHEIMER aantoonde, dat van alle sterolen alleen het cholesterol door de darm opgenomen wordt; ook de met cholesterol isomere sterolen, zoals allocholesterol en coprosterol, evenals het dihydrocholesterol en het bekende ergosterol worden niet geresorbeerd.

In de oudere stofwisselingsproeven van THANNHAUSER¹⁴⁾ e.a. werden de plantaardige sterolen bij het opmaken van de balans nog meegeteld; thans echter niet meer.

Behalve dat er voor de resorptie van het cholesterol in de darm vetten nodig zijn, is het waarschijnlijk, dat deze resorptie bevorderd wordt door de aanwezigheid van hydrophiele colloïden, zoals galzuren.

In de gal wordt constant een bepaalde hoeveelheid cholesterol afgescheiden; het darmkanaal resorbeert hiervan en van het met het voedsel opgenomen cholesterol een deel, terwijl

de rest door de faeces wordt afgevoerd. Deze laatste hoeveelheid verlaat als zodanig het lichaam of in omgezette toestand als coprosterol.

Uit stofwisselingsproeven van SCHÖNHEIMER, PAGE e.a. schijnt in de laatste tijd te zijn komen vast te staan, dat aanmerkelijke hoeveelheden cholesterol schijnen te verdwijnen, indien althans de balans *op bepaalde wijze* wordt opgemaakt. Het vermoeden mag dus worden uitgesproken, dat het cholesterol in de intermediaire stofwisseling zóver wordt afgebroken, dat het met de gebruikelijke analysemethoden niet meer kan worden aangetoond; een bewijs hiervoor echter zal eerst dan gegeven zijn, indien men stoffen kan isoleren, waarvan men zeker weet, dat het afbraakproducten van dit lipoid zijn.

Behalve dat cholesterol door de gal in het darmkanaal afgescheiden wordt, blijkt de darm zelf ook deze stof te secerner; dit spreken SALOMON en SPERRY als hun vermoeden uit. THANNHAUSER en JENKE zijn dezelfde mening toegedaan; het overgrote deel van het uit de intermediaire stofwisseling afkomstige cholesterol, dat in de darm afgescheiden wordt, wordt volgens SCHÖNHEIMER weer opgenomen.

Indien cholesterol alleen een z.g.n. „waste product” zou zijn, dan zou het cholesterolgehalte van het bloed bij afsluiting van de galwegen voortdurend moeten toenemen; dit zou in volkomen analogie zijn met het feit, dat de reststikstof van het bloed aanmerkelijk stijgt bij nierafsluiting.

Onderzoekingen bij leverziekten hebben aangetoond, dat bij volledige choledochus-afsluiting inderdaad het cholesterolgehalte van het bloed aanvankelijk toeneemt, doch dat na enige tijd bijna normale waarden gevonden worden.²⁸⁾ Een afvoer van cholesterol in genoemde gevallen naar zekere opslagplaatsen is in de regel niet aan te tonen; tevens is het niet in te zien, waarom deze ophoping (indien zij plaats had) eerst na een zekere tijd van het bestaan van de icterus zou plaats grijpen. Men zou kunnen denken, dat er een afbraak van deze stof plaats had, nadat eerst het cholesterolgehalte van het bloed gestegen was, maar naar de mening van LICHTWITZ¹⁾ is het aannemelijker dat het cholesterol van de gal slechts zó lang in het bloed wordt overgevoerd, zolang er gal gevormd wordt.

OVER DE SYNTHESE VAN CHOLESTEROL

Algemeen werd tot voor korte tijd aangenomen, dat het dierlijk lichaam niet in staat zou zijn cholesterol te bereiden en dat al het in het lichaam aanwezige cholesterol te danken zou zijn aan het opgenomen voedsel; in de laatste jaren werd dit standpunt echter langzamerhand verlaten.

Bij cholesterol-arme diëten, die bij proeven van CHANNON²⁹⁾ en THANNHAUSER¹⁴⁾ aan dieren verstrekt werden, bleek, dat veel meer cholesterol werd afgescheiden dan de hoeveelheid, die in het voedsel werd toegevoerd. GAMBLE en BLACKFAN²¹⁾ meenden dit te kunnen bewijzen uit stofwisselings-proeven bij zuigelingen; GARDNER en Fox³⁰⁾ gingen dit bij zuigelingen zowel als bij volwassenen na.

Als meerder bewijs hiervoor mogen de dierproeven van BEUMER en LEHMANN³¹⁾ worden aangehaald; jonge honden, die gedurende 6 weken een cholesterolvrije voeding ontvingen, bevatten na analyse een veel grotere hoeveelheid cholesterol dan honden uit hetzelfde nest, die aanstonds gedood waren.

Zie ook in dit verband THANNHAUSER en SCHABER,³²⁾ ELLIS en GARDNER³³⁾ en DAM.³⁴⁾

Er zal dus geen twijfel blijven bestaan aan het feit, dat cholesterol langs endogene weg gevormd wordt.

Waar echter in het lichaam cholesterol gevormd wordt is niet met zekerheid te zeggen.

CHAUFFARD³⁵⁾ meende, dat de bijnier in staat zou zijn cholesterol te produceren; ARTOM stelde hiervoor de lever, GRIGAUT het spierweefsel verantwoordelijk, en ABELOUS³⁶⁾ de milt.

Op de vraag uit welke stoffen in het lichaam cholesterol bereid wordt is het niet gemakkelijk een antwoord te geven.

Zowel na toevoer van eiwit als na opname van vet en van koolhydraat werd een stijging van het cholesterolgehalte waargenomen.³⁷⁾

ROSENHEIM³⁸⁾ neemt een directe omzetting van koolhydraat in cholesterol in het lichaam aan, terwijl WINDAUS in oliezuur de moedersubstantie wil zien.

Nadere bijzonderheden over de functies van het cholesterol in het menselijk lichaam vindt men in het boek van LETTRÉ en INHOFFEN.⁰⁾

LITERATUUR

- 0) H. LETTRÉ en H. INHOFFEN. „Über Sterine, Gallensäuren und verwandte Naturstoffe”.
- 1) L. LICHTWITZ. „Klinische Chemie”.
- 2) I. M. HEILBORN e.a. „The absorptionspectrum of cholesterol and its biological significance with reference to vitamin-D”. *Bioch. Journ.* 21-78-1927.
- 3) O. ROSENHEIM en A. WEBSTER. „The relation of cholesterol to vitamin-D”. *Bioch. Journ.* 21-127-1927.
- 4) O. ROSENHEIM en A. WEBSTER. „The parent substances of vitamin-D”. *Bioch. Journ.* 21-389-1927.
- 5) M. J. SHEAR en B. KRAMER. „Fractionation of irradiated cholesterol”. *J. biol. Chem.* 71-213-1926.
- 6) HÜRTHLE. *Zschr. physiol. Chem.* 21-342-1895.
- 7) H. MACLEAN en I. MACLEAN. „Lecithin and allied substances”, „The lipins”. *Monographs on Biochemistry.*
- 8) S. MINOVICI. „Contribution à l'étude du cholestérol au point de vue chimique et physiologique”. *Bull. Soc. Chim. biol.* 9-1129-1927.
- 9) F. RAPPAPORT. „Mikrochemie des Blutes”.
- 10) J. A. GARDNER en H. GAINSBOROUGH. „Studies on the cholesterol content of normal human plasma”. *Bioch. Journ.* 21-130-1927, 21-141-1927, 22-1048-1928.
- 11) J. CAMPBELL. „Cholesterol in health and disease”, „Critical review”. *Quart. Journ. Med.* 18-393-1925.
- 12) W. BLOOR en A. KNUDSON. „Cholesterol and cholesterolsters in human blood”. *J. biol. Chem.* 29-7-1917.
- 13) G. JORDANS. Dissertatie. Leiden 1929.
- 14) S. THANNHAUSER. „Über den Cholesterinstoffwechsel”. *Dtsch. Arch. klin. Med.* 141-290-1922.
- 14a) BACMEISTER. *Bioch. Zschr.* 26-223-1910.
- 15) P. MC. MASTER. „Studies on the total bile”. *J. exp. Med.* 40-25-1924.
- 16) H. GROSS. „Zum Cholesterinstoffwechsel”. *Chem. Zentrbl.* 4-220-1922.
- 17) J. GARDNER en H. GAINSBOROUGH. „Cholesterolsecretion in the urine”. *Bioch. Journ.* 19-667-1925.
- 18) L. ASCHOFF. „Ein Beitrag zur Myelinfrage”. *Verh. dtsch. path. Ges.* 166-1908.
- 19) M. LANDAU. „Die Nebennierenrinde”.
- 19a) H. SCHÖNHEIMER. *Zschr. physiol. Chem.* 160-61-1926, 177-142-1928.

- 20) TH. PANZER. „Über das sogenannte Protagon der Niere". *Zschr. physiol. Chem.* 48-519-1906, 54-239-1907.
- 21) J. GAMBLE en K. BLACKFAN. „Evidence indicating a synthesis of cholesterol by infants". *J. biol. Chem.* 42-401-1920.
- 22) C. KUSUMOTO. „Über den Cholesteringehalt des Hundefaeces bei gewöhnlicher Ernährung und nach Fütterung von Cholesterin". *Bioch. Zschr.* 14-411-1908.
- 23) J. MUELLER. „The mechanism of cholesterolabsorption". *J. biol. Chem.* 27-463-1916.
- 24) H. PRIBRAM. „Beitrag zur Kenntnis des Schicksals des Cholesterins und der Cholesterinester im tierischen Organismus". *Bioch. Zschr.* 1-413-1906.
- 25) S. THANNHAUSER. „Über den Cholesterinstoffwechsel". *Dtsch. Arch. klin. Med.* 141-290-1922.
- 26) zie 8.
- 27) S. THANNHAUSER. „Über Lipoidosen". *Klin. Woch.* 5-161-1934.
- 28) W. STEPP. „Blutcholesterin bei Icterus". *Beitr. path. Anat.* 69-233-1921.
F. ROSENTHAL en P. HOLZER. „Beitrag zur Lehre von den mechanischen und dynamischen Ikterusformen". *Dtsch. Arch. klin. Med.* 135-257-1921.
- 29) H. CHANNON. „Cholesterol synthesis in the animal body". *Bioch. Journ.* 19-424-1925.
- 30) J. GARDNER en F. FOX. „On the excretion of cholesterol in the animal organ". *Proc. Roy. Soc. London* 92-358-1923.
- 31) H. BEUMER. „Über Cholesterinbilanz und Cholesterinansatz". *Zschr. exp. Med.* 35-328-1923.
H. BEUMER en F. LEHMANN. „Über Cholesterinbildung im Tierkörper". *Zsch. exp. Med.* 37-274-1923.
- 32) S. THANNHAUSER en S. SCHABER. „Kann der tierische Organismus Cholesterin synthetisieren?" *Zsch. physiol. Chem.* 127-278-1923.
- 33) J. GARDNER. *Proc. Roy. Soc. London.* 81-128-1909.
- 34) H. DAM. „Über die Cholesterinsynthese im Tierkörper". *Bioch. Zsch.* 220-158-1930.
- 35) A. CHAUFFARD, G. LAROCHE en A. GRIGAUT. „La Cholestérinémie à l'état normal et pathologique". *Ann. Méd.* 8-69-1920.
Dezelfde. „Les dépôts locaux de la cholestérine". *Ann. Méd.* 8-331-1920.
Dezelfde. „Le cycle de la cholestérine dans l'organisme". *Ann. Méd.* 8-149-1920.
- 36) J. ABELOUS en L. SOULA. „Fonction cholestérinogène de la rate". *C. r. Soc. biol. Paris.* 83-455-1920.
- 37) KNAUER. *Zschr. physiol. Chem.* 176-151-1928.
- 38) ROSENHEIM. *J. Soc. Chem. Ind.* 51-464-1932.
- 39) BEUMER en FASOLD *Bioch. Zschr.* 259-471-1933.

HOOFDSTUK II

OVER DE BEPALING VAN CHOLESTEROL (VRIJ EN VERESTERD) IN MENSELIJK SERUM OF PLASMA VOLGENS VERSCHILLENDE METHODEN

Bij de bespreking van de verschillende bepalingswijzen van cholesterol, speciaal in serum, werd geen scherpe scheiding gemaakt tussen macro- en micromethoden; dit werd achterwege gelaten ter bekorting van dit proefschrift en om in de meeste gevallen hierdoor de historische groei van de methode niet in het gedrang te brengen.

A - DE COLORIMETRISCHE BEPALING VAN CHOLESTEROL

Cholesterol kan door een reeks kleurreacties worden aangetoond; de voornaamste van deze worden hier genoemd.

§ 1 - *Kleurreacties op cholesterol.*

a - Indien men zwavelzuur samenbrengt met cholesterol, ontstaat er, afhankelijk van de zuurconcentratie, een rode tot violette kleur.

ZWENGER ¹⁾, MOLESCHOTT ²⁾, SCHULZE ³⁾, SALKOWSKI ⁴⁾, HESSE ⁵⁾, HAGER ⁶⁾, DENIGÉS. ⁷⁾

b - Behandelt men een oplossing van cholesterol in chloroform met azijnzuur anhydriet en weinig sterk zwavelzuur, dan ontstaat eveneens een rood-violette kleur.

LIEBERMANN ⁸⁾, BURCHARD. ⁹⁾

c - VAN UDRANSKY ¹⁰⁾ is een reactie bekend, waarbij men aan een alcoholische cholesteroloplossing furfurol en zwavelzuur toevoegt; er ontstaat dan een intensieve voorbijgaande roodkleuring.

d - LIFSCHÜTZ ¹¹⁾ behandelt een azijnzure oplossing met benzoylperoxyde onder verwarming; na toevoegen van zwavelzuur ontstaat een groene kleur.

e - Bij verwarmen van cholesterol, opgelost in ijsazijn, met acetylchloride en zinkchloride ontstaat een rode kleur. Reactie van TSCHUGAJEFF.¹²⁾

f - Volgens EKKERT¹³⁾ krijgt men verschillende kleuren, als men mengsels van alcoholische cholesteroloplossingen met sommige aromatische aldehyden laat vloeien op sterk zwavelzuur.¹⁴⁾

g - LEVINE en RICHMAN¹⁵⁾ behandelen een chloroformoplossing van cholesterol met zwavelzuur, waarin Na-seleniet opgelost is; men neemt dan een purperrode kleur waar.

h - MEESEMACKER¹⁶⁾ deelt eveneens een reactie met acetylchloride en watervrij zinkchloride mede.¹²⁾

Bovengenoemde reacties zijn niet specifiek voor cholesterol, ook vele andere sterolen vertonen deze. Daar echter in bloed het cholesterol verre over de andere sterolen overweegt, zijn in principe al deze reacties voor bloedonderzoek toepasselijk.

KAHLENBERG¹⁷⁾ deelt enige nieuwe reacties mede; zo geeft cholesterol in oplossing kleuren met SO_2Cl_2 , TiCl_4 , SbCl_3 , AsBr_3 , terwijl STEINLE en KAHLENBERG¹⁸⁾ met SbCl_5 een quantitative bepaling van cholesterol uitwerkten.

Met benzidine en ijsazijn ontstaat volgens BAHL¹⁹⁾ een bruine, met rosaniline in chloroform een rode kleur.²⁰⁾

§ 2 - De reactie van Liebermann-Burchard.

Van de zoëven aangestipte kleurreacties heeft de niet specifieke van LIEBERMANN⁸⁾, die door BURCHARD⁹⁾ nader werd bestudeerd, de meeste toepassing gevonden.

Met behulp van deze reactie, waarmede zowel vrij- als veresterd cholesterol kan worden bepaald, zijn een groot aantal methodes uitgewerkt om het cholesterolgehalte van bloed te meten; zij verschillen vooral in de wijze, waarop dit lipoid uit bloed of serum wordt geëxtraheerd.

In verreweg de meeste gevallen wordt het cholesterol en zijn esters tenslotte in een chloroformoplossing verzameld, welke dan met azijnzuuranhydriet en sterk zwavelzuur wordt behandeld; de verkregen groene kleur vergelijkt men dan met een overeenkomstige groene kleur, ontstaan in een op analoge wijze behandelde cholesteroloplossing, waarvan men de concentratie nauwkeurig kent.

Over al deze werkwijzen in de literatuur medegedeeld wil ik hier verder niet uitweiden (21 ± 48); dat de ene methode het in nauwkeurigheid en reproduceerbaarheid verre wint van de andere, kan de lezing van deze publicaties en de toepassing ervan in de praktijk ten duidelijkste bewijzen.

Een ogenblik zou ik echter willen stilstaan bij een uitvoerig onderzoek van BLOCH⁴⁹⁾ over de genoemde reactie van LIEBERMANN-BURCHARD, dat m.i. de volle aandacht verdient.

Hij heeft de invloed nagegaan van het azijnzuuranhydriet, het zwavelzuur, de te bepalen cholesterolhoeveelheid, het oplosmiddel, de temperatuur en belichting op het principiële reactieverloop.

Van het oplosmiddel zegt hij onder meer, dat bij gebruik van 13 andere oplosmiddelen dan chloroform „positieve resultaten werden bereikt; noodzakelijk is alleen, dat de oplosmiddelen watervrij zijn.”

Quantitatief heeft BLOCH dit voor xylol nagegaan; alhoewel kwalitatief met chloroform geen verschil werd opgemerkt, was de kleurintensiteit driemaal zwakker dan wanneer chloroform gebruikt werd.

„Wanneer de reactie op de gebruikelijke wijze wordt uitgevoerd, heeft na 15 min. eerst $\frac{2}{3}$ deel van het cholesterol de kleurontwikkeling tot groen doorgemaakt; de rest reageert pas in de volgende tijd. Daar echter op dit tijdstip het maximum in de reactiesnelheid bereikt is en tevens na 15 min. altijd een relatief gelijke hoeveelheid van het cholesterol met het zuurmengsel gereageerd heeft, is de colorimetrische vergelijking dan toch verantwoord.”

Over het verloop der reactie zegt hij: „Na toevoegen van het zuurmengsel aan de cholesterolhoudende chloroform-oplossing heeft eerst een fysische- of reversibele chemische verandering van het cholesterol plaats (molecule-associatie, Umlagerung), die de spontaan optredende en weer snel verdwijnende roodkleuring veroorzaakt. Nu zet allengs de groenkleuring door, die met estervorming samengaat en die in tegenstelling met de roodkleuring slechts langzaam verloopt; hierdoor blijven de groengekleurde verbindingen en hun volgende reactieproducten naast elkaar bestaan, totdat al het cholesterol in een donkerbruin harsachtig eindproduct is overgevoerd.”

Verdere literatuur over de colorimetrische bepalingen volgens LIEBERMANN-BURCHARD vindt men opgegeven onder 50 ± 73 .

DAM ⁷⁴⁾ meent, dat de eenvoudigste manier om vrij- en veresterd cholesterol naast elkaar te bepalen is „het vrije cholesterol eerst als digitonide neer te slaan, het neerslag af te filtreren en in het filtraat de esters colorimeirisch te bepalen”; dit is volkomen in overeenstemming met de methode van BLOOR en KNUDSON.

POLANO ⁶⁷⁾, die deze methode heeft nagewerkt, is het niet gelukt hiermede quantitative resultaten te verkrijgen. „Een foutenbron is het feit”, meent hij, dat ook cholesteroldigitonide een positieve reactie volgens LIEBERMANN geeft.” Dit laatste is ook door mij waargenomen, alhoewel dit toch bij deze bepaling geen bezwaar kan zijn; in de te colorimetreren vloeistof, waarin zich de esters bevinden, is toch geen digitonide meer aanwezig, daar dit werd afgefiltreerd.

Met het digitonine zelf kan geen kleur volgens de genoemde reactie worden verkregen, zoals eigen ervaring leerde. Was dit wel het geval, dan zouden de methodes van DAM e.a. te verwerpen zijn. ⁷⁵⁾

§ 3 - Toepassing van andere kleurreacties.

De kleurreactie van SALKOWSKI ⁴⁾, die echter nog minder specifiek is voor cholesterol dan die van LIEBERMANN, heeft ook wel toepassing gevonden. WESTON ⁷⁶⁾ en KRASLEWSKI ⁷⁷⁾ maken in hun bepalingen van deze gebruik; laatstgenoemde beweert, dat andere plasmabestanddelen, die wel van invloed zijn op de LIEBERMANN-BURCHARD-reactie bij zijn methode, evenals bij die van ABRAMSOHN ⁷⁸⁾, geen merkbaar storende werking uitoefenen.

GRIGAR en THROMBEN, BERNOUILLI ⁷⁹⁾ en MILBRADT ⁸⁰⁾ passen de reactie van TSCHUGAJEFF ¹²⁾ toe; MILBRADT vond volgens deze methode 10 % hogere waarden dan met de gravimetrische van WINDAUS.

OBERMER en MILTON ⁸¹⁾ kozen bij hun bepaling de reactie, die cholesterol met nitrobenzoylchloride geeft en vergeleken bepaling- en standaardkleur in een stufenphotometer; COQUELET ⁸²⁾ maakt gebruik van de reactie van UDRANSKY ¹⁰⁾, een methode die geen toepassing gevonden heeft.

YOSHIMATSU ⁸³⁾ beschrijft een gecombineerde digitonine-kleurmethode voor de bepaling van vrij- en totaal cholesterol, de laatste na verzeping van de aanwezige esters. Het cholesterol wordt als digitonide neergeslagen, het neerslag opgelost in sterk zwavelzuur. Met phenolreagens wordt een gekleurde oplossing verkregen, die colorimetrisch te vergelijken is met een standaardoplossing van choldig, die op dezelfde wijze werd behandeld.

Op het eerste gezicht biedt dit voorschrift grote voordelen: het cholesterol wordt geïsoleerd in zulk een vorm, dat reiniging van deze stof vóór de eigenlijk colorimetrische bepaling mogelijk is; de kleurreactie zelf echter is, hetgeen mij meer-malen gebleken is, onbetrouwbaar en daarom niet aan te bevelen. Nadere bestudering verdient deze reactie echter wel, omdat de gevoeligheid zo groot is.

Aanvullende literatuur over de colorimetrische bepalingen van cholesterol is te vinden in de mededelingen 84 ± 99 .

§ 4 - *Is de colorimetrische cholesterolbepaling in het algemeen betrouwbaar te achten?*

MUELLER ¹⁰⁰⁾ komt tot de conclusie, dat, „wanneer oplossingen van zuiver cholesterol worden onderzocht, zowel de colorimetrische als de digitoninemethoden betrouwbaar zijn;” verder zegt hij: „colorimetrische analyses van bloed geven te hoge uitkomsten aan cholesterol, omdat op deze wijze andere in aether en chloroform oplosbare stoffen tegelijk worden bepaald; digitoninebepalingen zijn nauwkeuriger.”

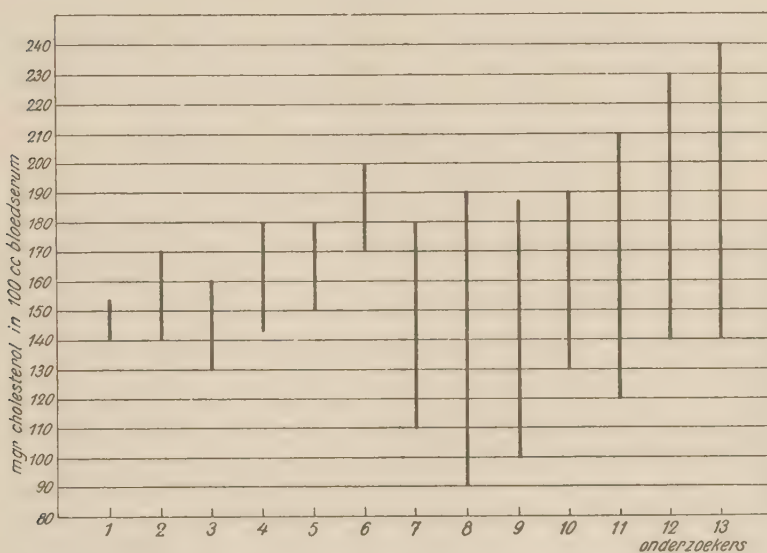
Door FEIGL ¹⁰¹⁾ werden eveneens vergelijkende onderzoeken tussen de verschillende methodes verricht; hij vergeleek met elkander op hun betrouwbaarheid de bepalingwijzen van BLOOR, WESTON-KENT, CSONKA, AUTENRIETH-FUNK e.a. en komt tot de conclusie, dat bij nauwkeurige uitvoering de genoemde methodes wel bruikbaar zijn, doch steeds veel foutenbronnen insluiten.

DELPRAT ¹⁰²⁾ wijt het verschil in uitkomst bij gebruikmaking van verschillende colorimetrische methodes grotendeels aan de wijze, waarop cholesterol en zijn esters uit bloed en serum worden geëxtraheerd. GARDNER ¹⁰³⁾ stelde een vergelijkend onderzoek in, waarbij hij tot ongeveer dezelfde gevolgtrekking kwam als FEIGL, terwijl HUECK ¹⁰⁴⁾ de methodes

van GRIGAUT, AUTENRIETH en FUNK een foutengrens van $-2,5$ tot 32% toekent. NEKLUDOW en CHALATOW¹⁰⁵⁾ vinden de methode van GRIGAUT relatief goed, alhoewel zij $\pm 10\%$ te hoge waarden levert; ook YASUDA¹⁰⁶⁾ vindt, dat de colorimetrische methodiek veel te hoge waarden geeft in vergelijking met andere.

Hoezeer de uitkomsten bij de verschillende colorimetrische bepalingen uiteenlopen, demonstreert volgende figuur, gebaseerd op een schema door DEGWITZ in zijn „Lipoïde en Ionen” gegeven.

TABEL I



Onderzoekers:

- | | |
|--------------------------|--------------------------|
| 1 - AUTENRIETH-FUNK. | 7 - BACMEISTER-ILENES. |
| 2 - LEUPOLD-BOGENDÖRFER. | 8 - FEIGL. |
| 3 - STEPP. | 9 - GRIGAUT. |
| 4 - OBAKEWITCH. | 10 - ROSENTHAL-PATRZECK. |
| 5 - CHAUFFARD. | 11 - GREMJATSCHKIN. |
| 6 - WIDAL. | 12 - KLEIN-DINKIN. |
| | 13 - KLINKERT. |

Bij het naslaan van de literatuur, die handelt over de bepaling van cholesterol in bloed, heeft het mij getroffen, dat zo vele methodes met entrain worden medegedeeld en ge-

propageerd, terwijl zij eigenlijk niet de toets van een strenge analytische critiek kunnen doorstaan; vele malen kwamen mij methodes onder het oog, die reeds waren gepubliceerd, voordat gebleken was, of zij in de praktijk voldeden en of zij overeenkomstige uitkomsten gaven met andere, die langs een geheel andere weg het cholesterol bepaalden.

Als nadelen in het algemeen van kleurreacties op cholesterol worden door LETTRÉ en INHOFFEN in hun boek genoemd:

a - Meestal zijn zij niet karakteristiek voor deze stof; dezelfde reactie vertonen ook phytosterolen, hoogmoleculaire onverzadigde alcoholen, vele harszuren en enkele terpenen.

b - Daar bij de meeste dezer colorimetrische reacties sterk zwavelzuur toegepast wordt, kunnen in het onderzochte materiaal voorkomende stoffen, die met dit geconcentreerde zuur bruine of zwart gekleurde verbindingen vormen, onnauwkeurigheid in de uitkomst veroorzaken.

Naar mijn persoonlijke mening kan een colorimetrische methode op bloed toegepast echter even goed betrouwbare uitkomsten geven als een andere, die b.v. op het neerslaan van cholesterol door digitonine berust; voorwaarde hiervoor echter is, (extractie van het lipoid en verzeping van zijn esters nog daargelaten) dat de eigenlijke kleurreactie met de grootste zorgvuldigheid wordt uitgevoerd en dat een kleurvergelijking wordt toegepast, die objectief is.

De nauwkeurigste bepaling van cholesterol en zijn esters in serum langs colorimetrische weg komt mij voor te zijn die, welke POLANO ²⁵⁾ in zijn dissertatie mededeelt; zij is fysisch en chemisch goed gedocumenteerd, levert volkomen reproduceerbare uitkomsten en is gebaseerd op de methode van BLOOR.

LITERATUUR

- 1) ZWENGER, *Ann Chem. u. Pharm.* 66-5-1848.
- 2) MOLESCHOTT, *C. rend.* 40-361-1855.
- 3) SCHULZE, *Zschr. f. Chem.* 13-454-1870.
- 4) E. SALKOWSKI, *Arch. f. Phys.* 6-207-1872.
- 5) HESSE, *Zschr. f. Chem.* 211-284-1882.
- 6) HAGER, *Real. Enz. ges. Pharm.* 8-129-1907.
- 7) DENIGÉS, *Zschr. f. anal. Chem.* 724-1904.
- 8) C. LIEBERMANN, *Ber. dtsh. chem. Ges.* 18-1804-1885.
- 9) BURCHARD, *Chem. Zentrbl.* 1-25-1890.
- 10) UDRANSKY, *Zschr. physiol. Chem.* 12-355-1888.
- 11) J. LIFSCHÜTZ, *Ber. dtsh. chem. Ges.* 41-252-1908.
- 12) TSCHUGAJEFF, *Zentrbl. f. Phys.* 362-1897.
- 13) L. EKKERT, *Pharm. Zentrbl.* 7-69-1928.
- 14) L. EKKERT, „Erkennung organischer Verbindungen im besonderen von Arzneimitteln”.
- 15) V. LEVINE en E. RICHMAN, *Proc. Soc. exp. Biol. a. Med.* 27-832-1930.
- 16) R. MEESEMACKER, *C. rend.* 190-216-1930.
- 17) L. KAHLENBERG, „On some new color-reactions of cholesterol”. *J. biol. Chem.* 52-217-1922.
- 18) J. STEINLE en L. KAHLENBERG, „A new method for the identification and estimation of cholesterol and certain other compounds”. *J. biol. Chem.* 67-425-1926.
- 19) E. BAHL, „Zwei Cholesterin-reaktionen”. *Bioch. Zschr.* 204-474-1929.
- 20) C. VAN ZIJP, „Microchemische bijdrage van cholesterine”. *Pharm. Weekbl.* 775-1933.
- 21) A. GRIGAUT, „Dosage colorimétrique de la cholestérine dans l'organisme”. *C. rend. Soc. biol.* 118-827-1910.
- 22) W. AUTENRIETH en A. FUNK, „Die Bestimmung der Gesamtcholesterins im Blut und in Organen”. *Münch. med. Woch.* 60-1243-1913.
- 23) W. BLOOR, „Studies on bloodfat”. „Fatabsorption and the blood lipids”. *J. biol. Chem.* 23-317-1915.
W. BLOOR, „The determination of cholesterol in blood”. *J. biol. Chem.* 24-227-1916, 26-417-1916, 29-437-1917.
- 24) G. JORDANS, Dissertatie. Leiden 1929.
- 25) M. POLANO, Dissertatie. Leiden 1934.
- 26) V. MYERS en E. WARDELL, „The colorimetric estimation of cho-

- lesterol in blood with a note on the estimation of coprosterol in feces". *J. biol. Chem.* 36-157-1918.
- 27) M. TAKATA. „Étude sur la simplification de la méthode colorimétrique par l'utilisation des matières colorantes". *Tohoku J. exp. Med.* 1-460-1920.
 - 28) F. KRASNOW. „A study of the Myers-Wardell method for the determination of cholesterol". *J. labor. a. clin. Med.* 14-967-1929.
 - 29) E. BAUMANN en O. HOLLY. „The cholesterol and lipoid-phosphorus contents of the blood of rabbits before and after suprarenalectomy". *J. biol. Chem.* 55-457-1923.
 - 30) W. MC. ADAM en C. SHISKIN. „The cholesterol content of the blood anaemia and its relation to splenic function". *Quart. J. Med.* 16-193-1923.
 - 31) S. LEIBOFF. „A simplified method for cholesterol determination in blood". *J. biol. Chem.* 61-177-1924.
 - 32) S. LEIBOFF. „Modification in the method for the determination of cholesterol in blood". *J. labor. a. clin. Med.* 15-776-1930.
 - 33) S. LING. „The determination of cholesterol in small amounts of blood". *J. biol. Chem.* 76-361-1928.
 - 34) D. SHEN. „Estimation of cholesterol in small amounts of blood". *Chin. J. Phys.* 3-405-1929.
 - 35) W. ENGELHARD. „Vereinfachte Methode zur Cholesterinbestimmung". *J. eksp. biol. i. Med.* 1926.
 - 36) W. GRUNKE. „Ausscheidung des Cholesterins im Harn". *Bioch. Zschr.* 132-543-1922.
 - 37) F. RAPPAPORT en H. ENGELBERG. „Eine Mikromethode der Cholesterinbestimmung". *Klin. Woch.* 1-700-1931.
 - 38) S. GÖRTZ. „Methode zur Bestimmung von Cholesterin in 0,1 cc Totalblut mit empfindlichen stabilen Farbreaktionen". *Bioch. Zschr.* 273-396-1934.
 - 39) A. WIRTA. „Über einige neue colorimetrische Methoden zur Bestimmung des Cholesterins". *Acta soc. med. ferm. duodec.* 8-10-1932.
 - 40) E. HERZFELD. „Über eine einfache quantitative Cholesterinbestimmungsmethode". *Schweiz. med. Woch.* 58-103-1928.
 - 41) E. MÜLLER. „Die colorimetrische Bestimmung des Cholesterins und seiner Ester in Geweben und Flüssigkeiten des tierischen Körpers mittels der L. B.'schen Reaktion". *Beitr. path. Anat. u. Path.* 80-140-1928.
 - 42) O. CANTONI. „Beitrag zu den Methoden der Blutcholesterinbestimmung". *Diagn. e. Techn. Lab.* 1-535-1930.
 - 43) K. SAITO. „Determination of cholesterol". *J. orient. Med.* 13-58-1930.
 - 44) H. BOHN en O. BICKENBACH. „Die Cholesterinbestimmung nach Autenrieth-Funk ausgeführt mit dem Pulfrich-Stufenphotometer". *Zschr. exp. Med.* 71-566-1930.
 - 45) J. FORBES. „Determination of cholesterol in blood, plasma and serum". *J. labor. a. clin. Med.* 16-520-1931.

- J. FORBES. „The determination of cholesterol in whole blood”. *J. labor. a. clin. Med.* 16-909-1931.
- 45) P. SCHUBE. „A method of measuring cholesterol”. *J. labor. a. clin. Med.* 18-306-1932.
- 47) J. GARDNER en M. WILLIAMS. „A critical study of the methods of estimating cholesterol and allied substances. *Bioch. Journ.* 15-363-1921.
- 48) O. MÜHLBOCK en C. KAUFMANN. „Gravimetrische Cholesterinbestimmung in Blut und Serum”. *Bioch. Zschr.* 233-222-1931.
- 49) A. BLOCH. „Das Cholesterin bei der Liebermann-Burchardschen Farbreaktion”. *Bioch. Zschr.* 257-170-1933.
- A. BLOCH. „Eine neue Methode der Cholesterinbestimmung”. *Schweiz. med. Woch.* 1-108-1931.
- A. BLOCH. „Die Cholesterinbestimmung in Blutserum; die Bloor'sche Methode”. *Schweiz. med. Woch.* 1-612-1931.
- 50) W. BLOOR, K. PELKAN en D. ALLEN. „Determination of fatty acids (and cholesterol) in small amounts of blood plasma”. *J. biol. Chem.* 52-191-1922.
- 51) G. SACKETT. „Modification of Bloor's method for the determination of cholesterol in whole blood or blood serum”. *J. biol. Chem.* 64-203-1925.
- 52) K. HANDOVSKY, K. LOHMANN en P. BOSSE. „Untersuchungen über den Zustand des Cholesterins im Blutserum”. *Pflügers Arch. Phys.* 210-63-1925.
- 53) G. DE TONI. „The colorimetric estimation of cholesterol and lecithin in blood in connection with Folin and Wu's system of blood analysis”. *J. biol. Chem.* 70-207-1926.
- 54) C. MC GLURE. „Quantitative methods for determining the cholesterol and the alcohol soluble and insoluble bilepigments of the duodenal contents”. *Boston med. surg. Journ.* 194-812-1926.
- 55) CH. DRAGONI. „Sur le dosage de la cholestérine du sang”. *J. d'urol.* 24-421-1927.
- 56) D. ACÉL. „Cholesterinbestimmung im Blut”. *Dtsch. med. Woch.* 1-431-1928.
- 57) G. FETTICH. „Eine einfache Methode zur Bestimmung des Blutcholesterins”. *Klin. Woch.* 1-362-1929.
- 58) L. TUTKEWITSCH. „Micromethode zur Bestimmung des freien Cholesterins im Blute”. *Bioch. Zschr.* 213-439-1929.
- 59) J. STODDARD en PH. DRURY. „A titration method for bloodfat”. *J. biol. Chem.* 84-741-1929.
- 60) E. DAY en A. BOLLIGER. „On a simplified method for the determination of blood cholesterol”. *Austr. J. exp. biol. a. med. Sci.* 7-41-1930.
- 61) E. BRILL en G. HOPE. „Photometrische Cholesterinbestimmung in Serum”. *Münch. med. Woch.* 1-142-1930.
- 62) O. KANNER. „Dosage direct de la cholestérine libre dans le sang par une méthode sans précipitation”. *C. r. Soc. biol. Paris.* 108-383-1931.

- 63) A. BERNHARD en I. DREHTER. „A simple and accurate method for the determination of cholesterol in blood, serum and plasma”. *J. labor. a. clin. Med.* 16-1225-1931.
- 64) J. MUNOZ. „Dosage des phosphatides et du cholestérol sanguin”. *C. r. Soc. biol. Paris.* 108-919-1931.
- 65) I. MIRSKY. „A note on the Liebermann-Burchard color reaction for cholesterol”. *J. labor. a. clin. Med.* 18-304-1932.
- 66) H. BANESJI. „A simple method for the determination of cholesterol in blood”. *J. Ind. Chem. Soc.* 10-573-1933.
- 67) M. POLANO. Dissertatie. Leiden 1934.
- 68) W. BLOOR en A. KNUDSON. „The seperate determination of cholesterol and cholesterolsters in small amounts of blood”. *J. biol. Chem.* 27-106-1916.
- 69) L. SURANYI en A. KORÉNYI. „Eine einfache Methode zur quantitativen Bestimmung des Cholesterins”. *Bioch. Zschr.* 160-178-1925.
L. SURANYI. „Beiträge zur Cholesterinbestimmungsmethode nach Suranyi und Korényi”. *Bioch. Zschr.* 180-293-1927.
- 70) S. NEUSCHLOSZ. „Über den Lösungszustand des Cholesterins im Blutserum”. *Bioch. Zschr.* 225-123-1930.
- 71) K. KUSNI. „Über die Kombination der kolorimetrischen mit der Digitonin Methode”. *J. bioch. Tokyo.* 18-237-1933.
- 72) L. VELLUZ. „Détermination simple du rapport ester cholestérol: cholestérol total dans le sérum sanguin”. *Bull Soc. clin biol. Paris* 15-845-1933.
- 73) G. LAROCHE, A. GRIGAUT en COSTES. „Les variations du rapport des esters du cholestérol au cholestérol total en pathologie”. *Presse médicale* 73-1417-1934.
- 74) H. DAM. „Einige Bemerkungen in Bezug auf die Bestimmung von Cholesterin”. *Bioch. Zschr.* 194-177-1928.
- 75) T. CSONKA. „A critique of certain data on the amount of cholesterol and fatty substances in the blood; together with a modification of the colorimetric method for estimating cholesterol”. *J. Biol. Chem.* 24-431-1916.
- 76) P. WESTON. „A colorimetric test for cholesterol”. *J. Med. Research* 26-47-1912.
P. WESTON en G. KENT. „Determination of the cholesterol content of human serum by the colorimetric method”. *J. Med. Research* 26-531-1912.
- 77) S. KRASTELEWSKI. „Zur Methodik der colorimetrischen quantitativen Bestimmung des Cholesterins im Blutserum”. *Bioch. Zschr.* 143-403-1923.
- 78) D. ABRAMSOHN. „Zur Methodologie der modifizierten Salkowskischen Reaktion für quantitative Cholesterinbestimmung in Blutserum”. *Bioch. Zschr.* 198-233-1928.
- 79) A. BERNOUILLI. „Eine neue Methode zur colorimetrischen Bestimmung des Cholesterins”. *Helv. chim. Acta* 15-274-1932.
- 80) H. MILBRADT. „Zur Bestimmung von Cholesterin und Phosphatiden

- in kleinsten Gewebs- und Blutmengen". *Zschr. physiol. Chem.* 216-181-1932.
- 81) E. OBERMER en R. MILTON. „A microphotometric method for the determination of free cholesterol and cholesterol esters in blood-plasma" *Bioch. Journ.* 24-345-1933.
 - 82) O. COQUELET. „La réaction furfurol-sulfurique". *C. r. Soc. biol. Paris.* 97-747-1927.
O. COQUELET. „Microdosage colorimétrique du cholestérol". *C. r. Soc. biol. Paris* 97-749-1927.
 - 83) S. YOSHIMATSU. „A new colorimetric method for free, ester and total cholesterol determination with 0,1 cc of blood". *Toh. J. exp. Med.* 17-147-1931.
 - 84) S. GÖRTZ. „Methode zur Bestimmung von Cholesterol in 0,1 cc Totalblut mit empfindlichen, stabilen Farbreaktionen". *Bioch. Zschr.* 273-396-1934.
 - 85) P. RITTER. *Zschr. physiol. Chem.* 34-430-1902.
 - 86) J. FEX. *Bioch. Zschr.* 104-82-1920.
 - 87) KUMAWAGA en SUTO. *Bioch. Zschr.* 8-212-1908.
 - 88) DORÉE en GARDNER. *Proc. Roy. Soc.* 81-109-1909.
 - 89) FRASER en GARDNER. *Proc. Roy. Soc.* 82-559-1909.
 - 90) TAMURA. *Bioch. Zschr.* 41-78-1912.
 - 91) TEILUM. *Hospitalstidende.* 140-1934.
 - 92) THUNNHERR. Dissertatie. Bazel 1931.
 - 93) STARUP. *Bioch. Zschr.* 270-74-1934.
 - 94) KIMMELSTIEL. *Zentrbl. allg. Path. u. path. Anat.* 36-491-1925.
 - 95) A. SCHULTZ. *Zentrbl. allg. Path. u. path. Anat.* 36-529-1925.
 - 96) A. WASITZKY. „Der Nachweis und die Bestimmung kleiner Mengen von Cholesterin und anderen Sterinen". *Mikrochemie N. F.* 8-289-1934.
 - 97) J. KAMLET. „A simplified microdetermination of cholesterol in whole blood". *J. labor. a. clin. Med.* 19-883-1934.
 - 98) J. JUER. „Eine einfache Mikromethode zur Bestimmung des freien und veresterten Cholesterins im Blut". *Bull. intern. Acad. pol. Sci. Cl. Med.* 10-377-1934.
 - 99) R. SCHOENHEIMER en W. SPERRY. „A micromethod for the determination of free and combined cholesterol". *J. biol. Chem.* 106-745-1934.
 - 100) J. HOWARD MUELLER. „A comparison of the results obtained by the colorimetric and gravimetric determination of cholesterol". *J. biol. Chem.* 25-549-1916.
 - 101) J. FEIGL. „Vergleichende Untersuchungen zur Methodik, mit besonderer Berücksichtigung des colorimetrischen Verfahren". *Zschr. ges. exp. Med.* 11-178-1920.
 - 102) E. DELPRAT. Dissertatie. Amsterdam 1921.
 - 103) J. GARDNER en F. FOX. „A critical study of the methods of estimating cholesterol and its esters in tissues". *Bioch. Journ.* 18-1058-1924.

- ¹⁰⁴⁾ W. HUECK. „Referat über den Cholesterinstoffwechsel”. *Zentrbl. allg. Path. u. path. Anat.* 36-18-1925.
- ¹⁰⁵⁾ W. NEKLUDOW en S. CHALATOW. „Vergleichende Studien über die Verwertung der quantitativen Cholesterinbestimmungsmethoden im Blutserum nach Gewichts- und Colorimetrieprinzip”. *Bioch. Zschr.* 208-60-1929.
- ¹⁰⁶⁾ M. YASUDA. „Contributions to the microdetermination of cholesterol”. *J. biol. Chem.* 92-303-1931.
- ¹⁰⁷⁾ BRÜCKNER. *Bioch. Zschr.* 270-346-1934.

B - DE GRAVIMETRISCHE BEPALING VAN CHOLESTEROL

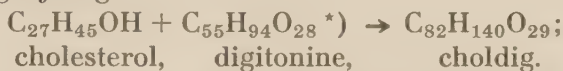
§ 1 - Welke gravimetrische methodes geeft de literatuur?

Vrij cholesterol geeft, in tegenstelling met zijn esters, met digitonine een onoplosbaar additieproduct; hierdoor is het mogelijk vrij cholesterol uit mengsels af te zonderen.

Als eerste heeft WINDAUS¹⁾ deze door RANSOM²⁾ gevonden reactie voor de quantitative bepaling van cholesterol toegepast door het afgescheiden digitonide, na reiniging, door weging te bepalen.

In het vervolg zullen wij de stof *cholesterol-digitonide* kortweg met de naam „choldig” aanduiden.

De vergelijking luidt:



Uit het gevonden gewicht aan choldig (a) kan de oorspronkelijk aanwezige hoeveelheid cholesterol berekend worden.

$$a : x = 1589 : 386,4.$$

a = gevonden gewicht choldig,

1589 = moleculair gewicht choldig,

386,4 = moleculair gewicht cholesterol;

dus:

$$x = a \times \frac{386,4}{1589} = a \times 0,2431 = \text{hoeveelheid cholesterol.}$$

WINDAUS neemt als factor 0,25 i.p.v. 0,2431 om verlies bij het reinigen van choldig door de wasvloeistoffen te compenseren; andere onderzoekers volgen hem hierin na. Dit is m.i. niet juist, daar afhankelijk van de gevolgde reinigingsmethode er bij de verschillende bepalingsmethodes wisselende hoeveelheden choldig in oplossing zullen gaan; daarom kan men beter de theoretische factor 0,2431 bij zijn berekeningen gebruiken.

*) Zie later hoofdstuk V.

FRASER en GARDNER³⁾, BOOM⁴⁾ en DELPRAT⁵⁾ passen de methode van WINDAUS in gewijzigde vorm toe.

THAYSEN⁶⁾ constateert, dat, wil het cholesterol quantitatief worden neergeslagen, een overmaat digitonine noodzakelijk is; dit volgt ook reeds uit de beschouwing van de theorie van het chemisch evenwicht, want als in de

$$K = \frac{C \text{ cholesterol} \times C \text{ digitonine}}{C \text{ choldig}}$$

de C digitonine groter wordt, moet van zelf het evenwicht naar de zijde van het choldig verschuiven. Belangrijk is echter, dat DAM⁷⁾ geconstateerd heeft, dat de samenstelling van het choldigneerslag varieert met de grootte van de gebruikte digitonine-overmaat. (Zie later over digitonine).

OSATO en HEKI⁸⁾ en ook RAPPAPORT en KLAPHOLZ⁹⁾ maken bij hun bepalingen van een methode gebruik, waardoor het choldig snel en volledig kan worden neergeslagen, hetgeen voor serieonderzoek van groot belang is; DELPRAT⁵⁾ ried aan het neerslag 5 dagen te laten staan alvorens af te filtreren.

SZENT GYÖRGYI¹⁰⁾ bestudeerde speciaal de zuivering van het choldig, die natuurlijk van het allergrootste gewicht is. Een opvolgende reiniging met aceton, aether, chloroform, aether, aceton en *heet water* geeft geen verliezen, indien telkens, althans voor zijn micromethode, niet meer dan 1,5 cc wasvloeistof wordt gebruikt; de gemaakte fout zou slechts 1,5—3 % bedragen.

Dikwijls wordt als wasvloeistof sterke alcohol gebezigd, wat volgens DAM⁷⁾ tot aanmerkelijke verliezen aanleiding kan geven. „Bij het uitwassen van het neerslag met alcohol gaat een niet onbelangrijk deel hiervan in oplossing, waarom men het beste doet het neerslag met een verzadigde oplossing van choldig te reinigen.”¹⁴⁾

MANCKE¹¹⁾ gebruikt bij de reiniging van zijn choldigneerslagen daarom alleen aceton, die daarenboven nog te voren in ijs afgekoeld wordt.

In dezelfde mededeling¹⁰⁾ wijst SZENT GYÖRGYI er met recht op, — en deze ervaring is zowel de mijne als die van anderen — dat de moeilijkheden bij het drogen en wegen van neerslagen in de micro-analyse groot zijn; hij zegt zelfs, dat de „buisjes”, die hij bij zijn bepaling gebruikt, „in de exsiccator belangrijk in gewicht toenamen”; hij geeft daarom een

speciale methode voor droging van microneerslagen, die door hem uitvoerig beproefd werd.

JENDRASSIK en BOKRÉTÁS¹²⁾ hebben ook deze questie bestudeerd en passen hun ervaringen bij een micro-cholesterolbepaling van hen zelf toe¹³⁾; zij bezitten weinig, te weinig vertrouwen in de colorimetrische techniek. Zij maken in hun bepaling gebruik van Seitzsche filterschijfjes, die het choldig volledig opnemen en wegen deze op een torsiebalans; m.i. zijn zij te optimistisch over de nauwkeurigheid van hun eigen methode.

In talrijke gevallen hebben zij hun uitkomsten vergeleken met die, welke door een colorimetrische methode waren verkregen; met de laatste waren de gevonden waarden veel hoger. Door verhitten van cholesterol ontstaan volgens deze onderzoekers stoffen, die niet met digitonine zijn neer te slaan, doch die wel een colorimetrische reactie geven, overeenkomende met stoffen, die in bloed voorkomen (Paracholesterin). Of de door hen gebruikte gravimetrische methode echter wel ideaal was, daartoe zou ik niet durven besluiten.

Door EWERT¹⁴⁾ werd enige tijd geleden een methode gepubliceerd voor de bepaling van de cholesterolfracties in orgaanweefsels; tegelijkertijd gaf hij een uitvoerige beschouwing over de foutgrenzen bij de gravimetrische bepaling.

Op de volledige verwijdering van de overmaat digitonine in het choldigneerslag werd door vele onderzoekers de aandacht gevestigd. Choldig is in alcohol en de meeste andere in aanmerking komende wasvloeistoffen niet geheel onoplosbaar.

Door DAM⁷⁾ werd reeds voorgesteld, daar hij verlies door reinigen van het neerslag met alcohol waarnam, een verzadigde alcoholische choldigoplossing te gebruiken.

EWERT heeft dit onderzoek nagewerkt en is tot dezelfde conclusie gekomen; reinigen van het neerslag echter met 90 % ige, in ijs afgekoelde acetone gaf eveneens geen verliezen. (MANCKE)

DAM deelde verder mede, dat bij werken met overmaat digitonine, groter dan de overmaat door THAYSEN⁶⁾ opgegeven, een gewichtstoename van het neerslag waar te nemen valt, die des te groter is naarmate een grotere overmaat digitonine aangewend wordt. Deze samenhang overmaat digitonine en gewichtstoename heeft DAM⁷⁾ in een curve neer-

gelegd en hierop een correctiemethode gebaseerd, waarmee men bij een bekende digitonine-overmaat uit het gevonden neerslag het werkelijk aanwezige cholesterol berekenen kan. Deze correctiecurve is echter niet zonder meer te gebruiken; zij geeft als enig veranderlijke grootheid de hoeveelheid digitonine in procenten aan van de stoechiometrisch berekende hoeveelheid en schenkt daarbij geen aandacht aan de concentratie, die *in werkelijkheid* in het aanwezige mengsel bestaat.

Om echter een correctiecurve van algemene geldigheid te bezitten, moet men met de concentratie van het *inderdaad* in overmaat aanwezige digitonine rekening houden, daar alleen deze concentratie en niet de absolute hoeveelheid digitonine van betekenis is. Het hangt namelijk af van de hoeveelheid cholesterol, die neergeslagen moet worden, of er veel of weinig digitonine in overmaat zal zijn. Het gebruik van correctiecurven bij bepaling van andere cholesterolconcentraties dan waarvoor zij vervaardigd zijn, heeft weinig zin.

EWERT heeft nu zulke curven opgesteld als resultaat van een onderzoek aan zuivere cholesteroloplossingen, die zoveel bevatten als bij extracties van organen te verwachten is; met behulp van deze grafieken kan men, steunende op de resultaten van DAM's onderzoek, de uit het gewicht van het neerslag berekende cholesterolhoeveelheid corrigeren, zodat men dan de werkelijke hoeveelheid vindt.

Ook is het mogelijk, dat de gevonden hoeveelheden cholesterol afhankelijk zijn van de digitoninezendingen van de fabriek; HESS, THAYSEN en DAM merkten dit reeds op; om volkomen zeker te zijn zou men daarom steeds het in gebruik genomen digitoninemonster met een ingewogen cholesteroloplossing tevoren moeten iijken.

TOMINAGA¹⁵⁾ spoorde evenals EWERT en DAM onjuistheden bij de gravimetrische bepaling op en kwam tot de conclusie, dat in vele gevallen een fout gemaakt werd van 5.4 %.

Indien men verder de literatuur op dit gebied raadpleegt, treft men een mededeling aan van FEX¹⁶⁾, betreffende de bepaling van vrij- en totaal-cholesterol; reinigen van het choldig met aether is eerste vereiste, terwijl hij de aether eerst enige minuten op het filter laat staan, alvorens door te zuigen.

VERHOEF vindt het choldig hygroscopisch, wat moeilijkheden

zou opleveren bij het wegen; BOOM wijt dit aan het feit, dat het choldig-neerslag bij het wassen waarschijnlijk niet volkomen bevrijd werd van KOH, dat bij de verzeping der esters nodig is en dat een zeer water aantrekkende stof is.

Volgens CAMINADE¹⁷⁾ is een mengsel van water, aceton en alcohol als wasvloeistof ideaal, daar de methodes van WINDAUS¹⁾ zowel als die van GARDNER³⁾ bij de reiniging verliezen geven; GIRARDIN¹⁸⁾ zuigt het choldig op een gehard filter af en wast o.a. met sterke alcohol, hetgeen verwerpelijk blijkt te zijn; op dezelfde wijze werkt MÜHLBOCK.¹⁹⁾

YORISADA HORIYE²⁰⁾ vindt met de titrimetrische methode van GYÖRGYI te hoge uitkomsten, doch met de gravimetrische van denzelfden onderzoeker evenals met die van TOMINAGA¹⁵⁾ betrouwbare waarden; zijn wasmethode is ongeveer dezelfde als die van CAMINADE.¹⁷⁾ Water werd in overmaat gebruikt. Dezelfde ervaringen als HORIYE deden HINRICHS en KLEMM²¹⁾ op.

GRIGAUT ziet in petroleumaether *geen* specifiek oplosmiddel voor de cholesterolesters uit het serum: hierop mag geen scheidingsmethode van het vrije cholesterol gebaseerd worden; JUER²²⁾ integendeel heeft dit bij zijn bepaling wel toegepast. Het enige echte scheidingsmiddel is digitonine, zoals ook KARMER en CHAUCOGNE²³⁾ berichten.

In de gravimetrische methode van MAN en PETERS²⁴⁾ wordt 99 % van het cholesterol teruggevonden en bij dubbelbepalingen slechts een verschil van 3,7 % opgemerkt.

Door ZWIKKER²⁵⁾ werd van de eigenschap, dat cholesterol met lithiumchloride in pyridine opgelost een quantitatief neerslag geeft, gebruik gemaakt om hierop een bloedcholesterolbepaling op te bouwen.

§ 2 - Over de oplosbaarheid van het cholesterol-digitonide.

De nauwkeurigheid bij de gravimetrische bepaling, kortom van *alle* bepalingen van cholesterol, waarbij van digitonine gebruik gemaakt wordt, hangt voor het grootste deel af van de zuivering van het neergeslagen choldig. Daar dit reeds voor de macro-bepaling van het grootste gewicht is, zal dit dus zeker de betrouwbaarheid van de micro-methode beïnvloeden.

Bij de weegmethode gaat het er om die wasvloeistoffen voor het choldig te kiezen, die de meest effectieve reinigingswer-

king uitoefenen en daarenboven zo weinig mogelijk van het neerslag oplossen.

Over die oplosbaarheid van het choldig in onderscheidene vloeistoffen is een en ander in de literatuur medegedeeld en het kwam mij noodzakelijk voor op deze plaats hiervan iets te vermelden.

BLOOR²⁶⁾, die de oplosbaarheid van choldig in aether te groot vond om nauwkeurige uitkomsten te kunnen verwachten, was daarom zeer sceptisch ten opzichte van de gravimetrische methode; MUELLER²⁷⁾ daarentegen vond, dat, uitgaande van zuivere cholesteroloplossingen *langs gravimetrische weg, theoretische waarden werden gevonden*, indien men bij de reiniging van aether en heet water gebruik maakt. Hij bepaalde de oplosbaarheid van zeer zuiver choldig in deze vloeistoffen; deze stof werd gedurende 24 uur bij kamertemperatuur geschud met aether; na filtratie werden 100 cc van de heldere oplossing drooggedampt en de rest bij 110° gedroogd. Het gemiddelde van 3 bepalingen leverde als resultaat, dat 0,7 mgr in 100 cc aether oploste; analoog hiermede vond hij, dat 0,6 mgr choldig in 100 cc heet water oploste.

Bij de methode van MUELLER wordt bij het reinigen van het choldig van 100 cc aether en 100 cc heet water gebruik gemaakt, zodat de fout, die gemaakt wordt, te verwaarlozen is. Colorimetrisch bepaalde hoeveelheden, b.v. volgens BLOOR, vallen $\pm 45\%$ te hoog uit. (MUELLER)

Volgens GARDNER en WILLIAMS²⁸⁾ is de oplosbaarheid van choldig in koud water, aceton, aether, aethylacetaat en benzol gelijk nul te stellen. Voor de oplosbaarheid van deze stof in alcohol geven zij de volgende getallen:

Bij 18° lossen in 100 cc methylalcohol op 470 mgr.

„ 18°	„	„ 100 „	aethylalcohol	„ 14 „	} 96% alcohol.
„ 72°	„	„ 100 „	aethylalcohol	„ 160 „	
„ 80°	„	„ 100 „	aethylalcohol	„ 30 „	
					50% alcohol.

WINDAUS vond, dat 16 mgr choldig in 100 cc absolute alcohol oplossen bij een temperatuur van 18°.

SCHÖNHEIMER en DAM²⁹⁾ bepaalden de oplosbaarheid van choldig zowel in methyl- als in aethylalcohol door schudden gedurende 24 uur bij 25° en gaven het resultaat in mgr per 100 cc oplossing op.

<i>Oplosmiddel:</i>	<i>Choldig in 100 cc:</i>
absolute alcohol	90 mgr
96 % alcohol	20 „
methylalcohol	500 „

Uit het bovenstaande blijkt zeer duidelijk, dat wassen van het digitonide met aethylalcohol, bij welke temperatuur dan ook, vermeden dient te worden; de oplosbaarheid van het choldig in deze vloeistof — zij het dan niet in dezelfde mate bij verschillende alcoholconcentraties — is te belangrijk, dan dat men de hierdoor gemaakte fout zou mogen verwaarlozen.

De beste en meest betrouwbare methode om cholesterolbepalingen in de kliniek langs gravimetrische weg uit te voeren, acht ik persoonlijk die van MANCKE¹¹⁾, waarin het choldig met afgekoeld aceton wordt uitgewassen.

Intussen moet met de opmerking van DAM⁷⁾ om n.l. het choldigneerslag te reinigen met een verzadigde oplossing van deze stof in alcohol en gebruik te maken van een ijkcurve¹⁴⁾ voor meer wetenschappelijke doeleinden, rekening worden gehouden. Bij mijn eigen contrôlebepalingen heb ik een gewijzigde methode van MANCKE in praktijk gebracht en er goede resultaten mede verkregen.

Interessant is het te vermelden, wat POLANO over de gravimetrische en de colorimetrische methodes in zijn dissertatie schrijft:

„De *gravimetrische* methodes hebben de reputatie het nauwkeurigst te zijn. Ze danken deze aan het feit, dat hun fout in het gunstigste geval de weegfout van de analytische balans bedraagt. Deze fout wordt relatief kleiner, naarmate de hoeveelheid af te wegen stof groter wordt.”

Hoe groter dus de hoeveelheid onderzocht materiaal is, des te groter is dus de nauwkeurigheid; met recht merkt hij op, dat bij medische analyses aan deze voorwaarde nooit kan worden voldaan.

„De *colorimetrische* methodes kunnen nooit nauwkeuriger zijn dan de fout van de gebruikte colorimeter bedraagt. Deze is optimaal klein voor een bepaalde kleurintensiteit en neemt

naar beide zijden toe. Voor de Pulfrichphotometer bedraagt deze optimaal kleine fout $\frac{1}{4}$ %."

„Een voordeel van de kleurreacties is, dat de hoeveelheid, die nodig is van de te onderzoeken stof, meestal zeer klein is, zo klein, dat bij weging een fout van 0,1 mgr. al meer dan 1 % zou bedragen."

Dat echter de kleurreacties ook „het voordeel hebben van zeer grote specificiteit" moet ik betwijfelen; dit blijkt het beste uit wat door mij bij de kleurreacties op cholesterol werd gezegd.

LITERATUUR

- 1) A. WINDÁUS. Habilitationsschrift, Freiburg 1903.
A. WINDAUS. *Ber. dtsh. Chem. Ges.* 42-238-1909.
A. WINDAUS „Über die quantitative Bestimmung des Cholesterins und der Cholesterinester in einigen normalen und pathologischen Nieren“. *Zschr. physiol. Chem.* 65-110-1910.
- 2) RANSOM. *Dtsch. med. Woch.* 27-194-1901.
- 3) M. FRASER en J. GARDNER. *Proc. Roy Soc.* 81-230-1909.
- 4) BOOM. Dissertatie. Amsterdam 1920.
- 5) E. DELPRAT. Dissertatie. Amsterdam 1921.
- 6) H. THAYSEN. „Nachprüfung Methode Windaus“. *Bioch. Zschr.* 62-89-1914.
- 7) H. DAM. „Einige Bemerkungen in Bezug auf die Bestimmung von Cholesterin“. *Bioch. Zschr.* 194-177-1928.
- 8) OSATO en HEKI. „Über die Schnelfällung des Cholesterindigitonids“. *J. biol. Chem.* 87-541-1930.
- 9) F. RAPPAPORT en R. KLAPHOLZ. „Eine titrimetrische Cholesterinbestimmungsmethode“. *Bioch. Zschr.* 258-467-1933.
- 10) A. v. SZENT GYÖRGYI. „Die gravimetrische Mikrocholesterinbestimmung“. *Bioch. Zschr.* 136-107-1923.
- 11) R. MANCKE. „Eine gravimetrische Methode zur Bestimmung von freiem und gebundenem Cholesterin in kleinen Blutmengen“. *Bioch. Zschr.* 231-103-1931.
- 12) L. JENDRASSIK en BOKRÉTÁS. „Zwei Verfahren zur exakten Abwägung in der Hitze getrockneter Filter und Niederschläge an der Torsionswaage“. *Bioch. Zschr.* 261-106-1933.
L. JENDRASSIK en K. KRIGL *Bioch. Zschr.* 220-19-1930.
L. JENDRASSIK en P. PÉTRAS. *Bioch. Zschr.* 226-381-1930.
- 13) L. JENDRASSIK en A. BOKRÉTÁS. „Mikrocholesterinbestimmung an der „Torsionswaage“. *Bioch. Zschr.* 274-367-1934.
- 14) B. EWERT. „Über die gravimetrische Cholesterinbestimmung und eine Methode zur Cholesterinanalyse von Organgewebe“. *Bioch. Zschr.* 263-149-1933.
- 15) F. TOMINAGA. „Über die gravimetrische Mikrocholesterinbestimmung“. *Bioch. Zschr.* 155-119-1925.
- 16) J. FEX. „Chemische und morphologische Studien über das Cholesterin und die Cholesterinester in normalen und pathologisch veränderten Organen“. *Bioch. Zschr.* 104-82-1920.

- 17) R. CAMINADE. „Sur quelques modifications apportées au dosage de la cholestérine par la méthode Windaus”. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 4-601-1922.
- 18) R. GIRARDIN. „Sur le microdosage pondéral du cholestérol”. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 8-813-1926.
- 19) O. MÜHLBOCK. „Eine gravimetrische Cholesterinbestimmungsmethode für klinische Untersuchungszwecke”. *Klin. Woch.* 2-2019-1930.
O. MÜHLBOCK en C. KAUFMANN. „Die gravimetrische Cholesterinbestimmung im Blut und Serum”. *Bioch. Zschr.* 233-222-1931.
- 20) YORISADA HORIYE. „Methodische Untersuchungen über Mikro-Cholesterin-Bestimmungen”. *Bioch. Zschr.* 202-403-1928.
- 21) A. HINRICHS en L. KLEMM. „Erfahrungen über die titrimetrische Mikro-Cholesterinbestimmung”. *Bioch. Zschr.* 210-191-1929.
- 22) J. JUER. „Eine einfache Mikromethode zur Bestimmung des freien und veresterten Cholesterins im Blut”. *Bull. intern. Acad. pol. Sci. Cl. Med.* 10-377-1934.
- 23) O. KARMER en M. CHAUCOGNE. „Étude comparative de la méthode de Karmar et du procédé de Grigaut pour le dosage de la cholestérine libre du sérum”. *C. r. Soc. Biol.* 113-57-1933.
- 24) E. MAN en J. PETERS. „Gravimetric determination of serum-cholesterol adapted to the Man and Gildea fatty acids method, with a note on the estimation of lipoid P”. *J. biol. Chem.* 101-685-1933.
- 25) ZWIKKER. „Cholesterinbepaling in bloed”. *Pharm. Weekbl.* 54-101-1917.
- 26) W. BLOOR en A. KNUDSON. „The sepearte determination of cholesterol and cholesterolesters in small amounts of blood”. *J. biol. Chem.* 27-107-1916.
- 27) J. HOWARD MUELLER. „A note on the solubility of cholesteroldigitonid”. *J. biol. Chem.* 30-39-1917.
- 28) J. GARDNER en M. WILLIAMS. „A critical study of the methods of estimating cholesterol and allied substances”. *Bioch. Journ.* 15-363-1921.
- 29) R. SCHOENHEIMER en H. DAM. „Über die Spaltbarkeit und Löslichkeit von Sterindigitoniden”. *Zschr. physiol. Chem.* 215-59-1933.

C - DE OXYDIMETRISCHE BEPALING VAN CHOLESTEROL

§ 1 - *De natte oxydatie van organische verbindingen, inzonderheid van cholesterol.*

In principe komt deze methode op het volgende neer:

Het vrije cholesterol wordt, evenals de cholesterolesters, op een of andere wijze uit het bloed of serum geëxtraheerd en het cholesterol (bij de esters eerst na verzeping) met digitonine neergeslagen. Het afgescheiden choldig wordt, na reiniging, met een zwavelzure kalium-bichromaatoplossing tot koolzuurgas en water geoxydeerd en de overmaat van het oxydatiemengsel jodometrisch bepaald. Uit het verschil tussen een blanco titratie van het oxydatiemengsel en de terugtitratie van de overmaat bij de bepaling kan het aanwezige cholesterol berekend worden.

Berekening:

Cholesterol + digitonine $\rightarrow$ choldig.



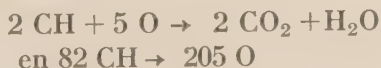
1 mol. cholesterol $\rightarrow$ 1 mol. choldig.

1 „ $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}^{\frac{1}{2}}$ $\rightarrow$ 1 „ $\text{C}_{82}\text{H}_{140}\text{O}_{29}$.

Wanneer men hiervan aftrekt $\text{H}_{58}\text{O}_{29}$, wat overeenkomt met $29\text{H}_2\text{O}$, die dus niet geoxydeerd behoeven te worden, houdt men van het mol. choldig ter verbranding over:

$$\begin{array}{r} \text{C}_{82}\text{H}_{140}\text{O}_{29} \\ \text{H}_{58}\text{O}_{29} \\ \hline \text{C}_{82}\text{H}_{82} \end{array} \quad \text{dus } 82 \times \text{CH}.$$

Uit de vergelijking:



volgt, dat:

$82 \text{CH} = 1 \text{ mol choldig} \rightarrow 205 \text{O nodig hebben.}$

*) Zie later hoofdstuk V.

Dus:

1589 gr. choldig nodig 3280 gr. O.

Uit:



volgt, dat:

16 gr. O = 1 gramatoom overeenkomt met 1 L 2 N. $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.
(N = normaal)

Dus ook, dat:

8 mgr O overeenkomen met 1 cc 1 N. K. bichroomaat.

We hebben gezien dat:

3280 mgr O overeenkomen met 1589 mgr choldig.

Hieruit volgt:

1 mgr. choldig komt overeen met 0,259 cc 1 N. K. bichroomaat;
1 „ „ „ „ „ 2,59 „ 0,1 N. „ „

en als we gebruik maken van:

mgr. cholesterol = $0,2431 \times$ mgr choldig,

dan komt

1 mgr cholesterol overeen met 10,65 cc 0,1 N. K. bichroomaat.

Bij de later door mij te beschrijven methode wordt, indien alle voorzorgen in acht genomen worden, het choldig inderdaad volledig tot CO_2 en H_2O geoxydeerd.

Bij de oxydimetrische bepalingen paste men in het begin alleen K-bichroomaat als oxydatiemiddel toe; BANG¹⁾ was de eerste, die hiermede werkte. In een critische beschouwing van de microcholesterolbepaling volgens BANG, maakt MAAS²⁾ enige opmerkingen, die in het algemeen voor deze soort van bepalingen verdienen gelezen te worden. Haar ervaringen zijn ondermeer, dat het te gebruiken glaswerk absoluut zuiver moet zijn en dat zelfs vezeltjes van het papier, waarop het bloed werd gedroogd en waaruit het cholesterol werd geëxtraheerd, van grote invloed zijn op de uitslag van de bepalingen. Daar voor de berekening der uitkomsten een empirisch vastgestelde factor gebruikt wordt en dus grote gelijkmatigheid in de uitvoering een vereiste is, blijkt in haar methode ook de vorm van het gebruikte glaswerk van invloed te zijn.

BLOOR, die zich veel heeft beziggehouden met de bepaling

van cholesterol in bloed en met groot succes, heeft de oxydatieve methode nader uitgewerkt.³⁾

SZENT GYÖRGYI⁴⁾ maakte bij zijn titrimetrische cholesterolbepaling eveneens van K-bichromaat en sterk zwavelzuur gebruik als oxydatiemiddel; tevens deelde hij een proefondervindelijk vastgestelde factor mede om de hoeveelheid cholesterol te kunnen berekenen uit de verbruikte hoeveelheid oxydatiemengsel. Deze bepaling, zowel als die van anderen, is niet betrouwbaar, daar slechts geringe afwijking van de werkwijze totaal verkeerde uitkomsten kan geven; men heeft hier het verloop der oxydatiereactie niet volkomen in de hand.

NICLOUX⁵⁾ heeft hierin verbetering gebracht; hij deelde mede, ten dele als gevolg van eigen waarneming, ten dele van die van anderen, dat, indien men K-bichromaat *alleen* als oxydatiemiddel (in zwavelzuur-milieu) voor organische stoffen bezigt, de verbrandingsuitkomsten minder zeker zijn dan wanneer men tevens in het mengsel Ag-chromaat oplost. NICLOUX staaft dit met vele analyseresultaten, die duidelijk het grote verschil in betrouwbaarheid tussen de andere methode en de zijne doen uitkomen.

SIMON⁶⁾ heeft nagegaan of behalve Ag-chromaat ook chromaten van andere metalen, zoals Pb, Ni, Co of Hg, de verlangde oxydatie van organische stoffen bevorderen. Resultaat was dat Ag-chromaat de volkomen verbranding van deze verbindingen het volledigst bevorderde.

Naar aanleiding van dit onderzoek van SIMON werd door mij nagegaan of Ceri-zouten in plaats van Ag-chromaat eveneens een versnellende werking op de oxydatie uitoefenen; deze werden door mij gekozen, omdat zij ook bij andere oxydimetrische bepalingen toepassing vinden.⁷⁾ ⁸⁾ Het onderzoek leverde tot resultaat, dat bij blanco cholesterolbepalingen veel lagere waarden werden gevonden, dan wanneer ik van K-Ag-chromaatoplossingen gebruik maakte; in dit laatste geval werden quantitatieve waarden verkregen.

In tegenstelling met deze uitkomsten, die mij van het verder toepassen van Ceri-verbindingen deden afzien, geeft RAPPA-PORT⁹⁾ een voorschrift ter oxydimetrische bepaling van de totale hoeveelheid cholesterol in bloed, waarin hij van de katalytische werking van Cerisulfaat in werkelijkheid gebruik maakt, en volgens zijn opgave met succes.

„Het gebruik van aangezuurde Cerizoutoplossingen als maat-analytisch oxydatiemiddel, volgens FURMAN¹⁰⁾, werd reeds lang door verschillende onderzoekers aanbevolen.”

ATANASIU¹¹⁾, WILLARD en YOUNG¹²⁾ en FURMAN¹³⁾ onderzochten de toepassingen van cerisulfaat als oxydimetrische vloeistof systematisch.

FURMAN noemt de volgende grote voordelen, die eigen zijn aan gestelde oplossingen van Cerisulfaat:

- 1 - bestendigheid tot het kookpunt,
- 2 - bruikbaarheid voor de titratie van oplossingen, die met zoutzuur zijn aangezuurd.

Organische verbindingen, die langs deze weg bepaald werden, zoals hydrochinon¹⁴⁾ en enige organische zuren, leveren geheel andere oxydatieproducten op dan in het geval, dat zij met Ag-K-chromaat-mengsel geoxydeerd worden.

SNETHLAGE¹⁵⁾ vestigt er de aandacht op, dat de concentratie van het aanwezige zwavelzuur in het oxydatiemengsel in de chromaatmethode een belangrijke rol speelt; SNETHLAGE oxydeert alleen met K-bichromaat, over welke wijze van werken FELLENBERG¹⁶⁾ zich reeds weinig enthousiast uitliet; hij komt tot de conclusie, dat het oxydatievermogen van chroomzuur maximaal is bij een zwavelzuurconcentratie van 80 %.

(Bij de door mij hieronder aanbevolen methode wordt een ongeveer evengrote concentratie toegepast).

Onderzoekingen, die zich met de natte oxydatie van organische verbindingen bezighouden, zijn o.a. te vinden bij:

FRANZ en LUTZE ¹⁷⁾ ,	CORDEBARD ²¹⁾ ,
WHITE en HOLKEN ¹⁸⁾ ,	SCHUTTE ²²⁾ ,
STAPP ¹⁹⁾ ,	WINDAUS ²³⁾ ,
J. DURAND ²⁰⁾ ,	WILDE en LOCHTE ²⁴⁾ ,
LAUERSEN en VOIT ²⁵⁾ .	

§ 2 - *Opmerkingen over de oxydimetrische bepaling van choldig.*

OKEY²⁶⁾, HINRICHS²⁷⁾ en KLEMM²⁸⁾ voegen aan het oxydatiemengsel Ag-chromaat toe om de verbranding vollediger te doen verlopen; OKEY modificeerde de titrimetrische methode van SZENT-GYÖRGYI⁴⁾, terwijl HINRICHS, evenals TOMINAGA, de opmerking maakt, dat bij verhitting van het K-Ag-chromaat-mengsel in zwavelzuur de titer terugloopt. HINRICHS

en KLEMM verhitten dit mengsel daarom tevoren enige tijd en filtreren het dan door glaswol in de voorraadfles; de titer blijft dan lang constant. Volgens mijn eigen ervaring maakt het practisch geen verschil of men vóór de titerstelling het oxydatiemengsel eerst verhit of aanstonds jodometrisch stelt; voorwaarde is slechts, dat tegen organische verontreiniging streng wordt gewaakt en dat het bij de eigenlijke verbranding niet boven 130° verhit wordt. 2), 29), 30)

De voordeligste temperatuur voor de verbranding van het choldig is 124° , zoals ook TURNER³¹⁾ en YASUDA³²⁾ opgeven; MONASTERIO³³⁾ oxydeert het choldig op een zandbad bij 160° ; dit moet ik echter, zoals eigen contrólebepalingen mij leerden, beslist afraden. PETERS en VAN SLIJKE merken ook reeds op, dat bij temperaturen boven 130° grote kans bestaat, dat er vrije zuurstof ontwijkt, waardoor de uitkomsten van de bepaling dus te hoog zouden uitvallen.

Alle methoden, die hieronder verder besproken zullen worden, passen het K-Ag-chromaatmengsel in zwavelzuur opgelost als oxydans toe; de methodes verschillen alleen in de wijze, waarop het choldig wordt afgescheiden en gereinigd en hoe het geoxydeerd wordt.

OSUKA³⁴⁾ past deze verbrandingsmethode op verschillende organische stoffen toe, welke methode door KANITZ³⁵⁾ om zijn nauwkeurigheid geroemd wordt; de laatste wijzigde alleen de door OSUKA gebruikte apparatuur.

KATSURA³⁶⁾ e.a. beschrijven een bepaling van vrij- en totaal cholesterol langs de oxydatieve weg en maken hierbij de opmerking, dat volgens de methode van BLOOR³⁾ de oxydatie niet quantitatief gelukt; slechts ongeveer 95 % van het cholesterol wordt teruggevonden. Zij verhitten het gereinigde choldig met het chromaatmengsel gedurende een uur op een waterbad in een gesloten buis. Voor de berekening van het aanwezige cholesterol maken zij gebruik van een empirisch gevonden factor, die dus gelijkvormigheid bij het werken vooropstelt.

OKEY filtreerde het choldig over asbest in een Gooch-kroes en zoog het oxydatiemengsel warm door het filter heen; de oxydatie is nu nog niet beëindigd en daarom past hij een naverwarming toe om de verbranding volledig te doen verlopen.

MARY TURNER ³¹⁾ brengt enige belangrijke veranderingen in de methode van OKEY aan en wijdt speciaal haar aandacht aan het neerslaan en de zuivering van het choldigneerslag; zij dampst het alcoholisch serumextract in een centrifugeerbuis in, voegt digitonine toe en laat verder de zuivering en de oxydatie van het choldig in dezelfde buis verlopen. (Bij mijn eigen voorschrift heb ik deze werkwijze nagevolgd).

De samenstelling van het oxydatiemengsel is hetzelfde als bij OKEY ²⁶⁾, evenals de temperatuur bij de verbranding.

YASUDA ³²⁾ maakt de opmerking, dat OKEY's methode slechts met zuivere cholesteroloplossingen goede resultaten geeft; hij verhit het choldig met het oxydatiemengsel 30 min. i.p.v. 20 min. bij een temperatuur van 122—126°. Voor de bepaling van cholesterol in weefselextracten is de methode van OKEY volgens YASUDA niet deugdelijk; in het choldig blijven dan altijd oxydabele verontreinigingen achter, die niet weg te wassen zijn. Voor de bepaling van cholesterol in bloed blijkt dit echter bij accuraat werken niet te gelden.

YASUDA ³²⁾ dampst het serumextract, volgens BLOOR bereid, op een waterbad in een koolzuurstroom droog, nadat digitonine reeds was toegevoegd; hierna lost hij de overmaat digitonine met heet water, waaraan aceton toegevoegd was, op en filtreert het choldig onder naspoelen met aceton op een Schott-glasfilter.

Met aether wordt tenslotte het filter duchtig nagespoeld.

Het aldus gezuiverde choldig lost hij nu in absolute alcohol op en dampst deze, nadat de oplossing door het filter gezogen is, in een koolzuurstroom weg.

M.i. zijn vele bezwaren tegen deze methode aan te voeren:

1e - het choldig is in aceton van kamertemperatuur aanmerkelijk oplosbaar,

2e - quantitatief een neerslag van een Schott-glasfilter oplossen is zeer riskant en kan twijfelachtige uitkomsten geven,

3e - de laatste resten alcohol, waarin het choldig tenslotte werd opgelost, worden moeilijk op deze manier verwijderd; blijven zij aanwezig, dan kunnen zij de gevonden waarden aanmerkelijk te hoog doen uitvallen.

YASUDA ³²⁾ vindt bij vergelijking van zijn methode met de colorimetrische in het laatste geval 15 % hogere waarden.

Welke colorimetrische bepaling gevolgd werd, deelde YASUDA niet mede.

SCHEFFER ³⁷⁾ vindt volgens de methode van BLOOR ³⁾ dikwijls te hoge waarden; waarschijnlijk is dit volgens hem te wijten aan te sterke verwarming van het serumextract bij de verzeping der cholesterolesters. Hierdoor zouden dan later niet te verwijderen oxydabele stoffen ontstaan, die de uitkomsten ongunstig beïnvloeden.

KATSURA ³⁶⁾ verzeept daarom de esters met natronloog i.p.v. met Na-aethylaat, daar de laatste stof organische substantie aan het extract zou afgeven; persoonlijk hebben wij, ofschoon wij ook Na-aethylaat als verzepingsmiddel gebruiken, van deze bezwaren geen hinder ondervonden. Het spreekt vanzelf, dat deze bepaling nauwkeurig moet worden uitgevoerd.

BACKLIN ³⁸⁾ past een oxydimetrische bepaling van choldig toe, waarin hij het gevormde koolzuurgas volumetrisch in het toestel van v. SLIJKE meet; deze gashoeveelheid is dan een maat voor de aanwezige hoeveelheid cholesterol.

FRÖLICHER ³⁹⁾ werkt nog met de oude methode van SZENT-GYÖRGYI ⁴⁾, waarin alleen K-bichroomaat gebruikt wordt. De door hem aangegeven vergelijking bij de berekening zijner resultaten:

1 mgr cholesterol komt overeen met 8,4 cc 0,1 N. oxydatiemengsel, klopt niet met de theoretisch te berekenen waarde. (Zie vroeger).

Het hangt bij zijn methode van de hoeveelheid cholesterol en oxydatiemengsel af of de oxydatie van het choldig tot CO₂ en H₂O volledig uitvalt.

§ 3 - Voorschrift voor een bepaling van vrij- en totaal cholesterol.

OPLOSSINGEN:

I - Onteiwitmengsel:

3 delen alcohol 96 % mengen met 1 deel aether; beide eerst overgedestilleerd.

II - Zoutzure alcohol:

absolute alcohol verzadigen met droog zoutzuurgas.

III - *Oxydatie-mengsel:*

a - Ag-chromaat:

Los in een centrifugeerbuis 1 gr Ag NO_3 in 5 cc water op, voeg hieraan toe 10 cc water, die 1 gr $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ in oplossing bevatten, meng en centrifugeer het neerslag. Was het Ag-chromaat tweemaal met aqua dest., telkens onder hernieuwd centrifugeren, en decanteer telkens het waswater.

b - K-bichromaat 1 N:

Los 49 gr zuiver $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ in water op tot 1 L.

Het bij *a* verkregen Ag-chromaat lost men in 100 cc sterk zwavelzuur op. Neem van deze oplossing 40 cc en voeg hieraan toe 100 cc oplossing *b*. Het verkregen mengsel noemen we het „oxydatiemengsel”.

IV - *Thio 0,1 N.*

V - K J-oplossing:

75 gr K J oplossen in aqua dest. tot 100 cc (in bruine fles met druppel kwik bewaren).

VI - Stijfseloplossing:

0,5 gr oplosbaar zetmeel in 100 cc aqua dest.

VII - Digitonine-oplossing:

1 gr digitonine (MERCK) oplossen in 100 cc alcohol 96 %.

VIII - Na-aethylaatoplossing:

Los onder afkoeling 2,5 gr met aether gereinigd natrium in 100 cc absolute alcohol op en bewaar de oplossing in goed sluitende bruine fles.

Wegwerpen als de oplossing bruin geworden is.

IX - *Zwavelzuur 4N.*

X - K-bichromaat 0,1 N:

Los 4,9036 gr $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (K.p.a.) tot 1 L in aqua bidest op; het $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ moet tevoren in poedervorm tot constant gewicht gedroogd zijn.

*Methode:**Serum-extractie*

Pipetteer 5 cc niet-haemolytisch serum en laat deze druppelsgewijs lopen in een maatkolf van 50 cc, waarin zich reeds $\pm$ 30 cc (I) bevindt; schud onder het indruppelen voortdurend en laat dan 5 min. staan. Verhit nu de kolf in een waterbad, tot juist koken, onder voortdurend schudden, koel onder de kraan af, vul met (I) tot de maatstreep aan en meng goed. Giet zo mogelijk de inhoud ineens op een vetvrij vouw-filter, dat geplaatst is op een kolf met stop; bedek het filter om verlies door verdamping te voorkomen met een horloge-glas.

Het verkregen filtraat noemen wij het „*serumextract*”.

BEPALING VRIJ CHOLESTEROL

Neerslaan choldig:

Pipetteer 10 cc serumextract in een centrifugeerbuis, plaats deze dan in de damp van een kokend waterbad in hellende stand en damp af tot de reuk van aether verdwenen is.

Voeg nu 1 cc (VII) onder schudden toe en damp de alcohol tot bijna droog af. Het choldig slaat nu volledig neer. Voeg na afkoelen 10 cc aether toe en zet de buis met neerslag tot de volgende dag weg.

Reinigen choldig:

Centrifugeer de buis 10 min. sterk en zuig de aether met een capillair weg. Herhaal de reiniging met aether nog tweemaal, en warrel bij de laatste keer het neerslag met een puntig roerstaafje op.

Wanneer de aether voor de laatste maal is verwijderd, damp dan op een waterbad tot droog af.

Het van lipoïden bevrijde choldigneerslag wordt nu drie-maal met kokend water (aqua bidest) gewassen, telkens met ongeveer 15 cc, waaraan 0,5 cc alcohol is toegevoegd. Telkens na het centrifugeren wordt het water weggezogen; de centrifugeertijd is hier langer (20-30 min.), daar het neerslag in water moeilijker „pakt” dan in aether. Hier wordt grote zorgvuldigheid vereist!

Bij elke reiniging met heet water wordt het neerslag opgevarreld en dan gecentrifugeerd.

Het aldus gereinigde neerslag van choldig droogt men in een stoof bij 102°, waarna de oxydatie uitgevoerd kan worden.

BEPALING TOTAAL CHOLESTEROL

Verzeping cholesterolesters:

Pipetteer 5 cc serumextract in een kolfje met ingeslepen luchtkoeler (kooksteentjes!).

Damp eerst nog de aether uit het open kolfje op een electrisch zandbad af en voeg dan 2 cc (VIII) toe. Plaats de luchtkoeler op het kolfje en laat de vloeistof ruim een uur op het zandbad voorzichtig koken.

Koel hierna af tot kamertemperatuur, voeg 1 druppel phenolphtaleïne-oplossing toe en neutraliseer de inhoud met (II) tot juist kleurloos.

Na hernieuwd afkoelen brengt men 2 cc absolute aether in het kolfje, waardoor het gevormde Na-chloride volkomen neerslaat, en filtreert nu de inhoud quantitatief door een vetvrij, plat filter in een centrifugeerbuis. Kolfje en filter wast men driemaal met aether na.

De inhoud van de centrifugeerbuis wordt nu in de damp van een kokend waterbad tot ± 5 cc ingedampt en dan 1 cc (VII) toegevoegd. Handel verder als onder vrij cholesterol beschreven staat.

Oxydatie choldig:

In de buis met het droge choldig plaatst men een puntig glazen staafje en voegt nu voorzichtig uit een buret toe:

a - bij het choldig van het *vrij* cholesterol 5 cc (III),

b - bij het choldig van het *totaal* cholesterol 7 cc (III).

(Bij zeer hoge cholesterolwaarden moet men nog meer oxydatiemengsel gebruiken, hetgeen men bemerkt, als de vloeistof olijfgroen van kleur wordt).

Roer het choldigneerslag met het staafje op en plaats de buis in een stoof van 124° (122°-126°). Verwarm niet langer dan 25 min. en controleer dan of alle organische stof verdwenen is, ook langs de wanden. Is dit laatste niet het geval,

bevochtig dan de wand van de buis met het oxydatiemengsel door middel van het roerstaafje en oxydeer nu nog 10 min. in de stoof bij 124°.

Is de kleur van het mengsel olijfgroen geworden, voeg dan nog 2 cc (III) toe, alvorens voor de tweede maal te verhitten.

Na de verbranding koelt men af en spoelt de inhoud van de buis met aqua dest. in een erlemeyer van 300 cc, waarin zich reeds ± 100 cc aqua dest. bevinden.

Koel nu de kolf af, voeg 4 cc (V) toe en schud nog niet, om verlies aan jodium te voorkomen; laat nu onder zeer voorzichtig schudden thio 0,1 N toevloeien, voeg op het einde der titratie stijfsel (VI) toe en schud nu krachtig om. De blauwe kleur in de vloeistof moet *juist* verdwenen zijn.

Stellen oxydatiemengsel:

Breng 5 cc (III) in een centrifugeerbuis en verhit deze ± 20 min. in een stoof bij 124°. Na afkoeling spoelt men de inhoud in een erlemeyer van 300 cc, waarin zich reeds ± 100 cc aqua dest. bevinden en voert de verdere titratie als bovenomschreven uit.

De titer van de thio stelt men met behulp van oplossing (X) op de bekende wijze.

Berekening:

1 - *vrij* cholesterol.

mgr cholesterol per 100 cc serum:

$$100 \times b \times \frac{0,94157}{a}$$

2 - *totaal* cholesterol.

mgr cholesterol per 100 cc serum:

$$200 \times b \times \frac{0,94157}{a}$$

a = aantal cc thio, nodig voor het stellen van 10 cc 0,1 N K-bichromaat (X).

b = verschil van het aantal cc thio, nodig bij de blanco bepaling van het oxydatiemengsel en het aantal cc thio, nodig om de overmaat oxydatiemengsel terug te titreren.

Opmerkingen:

- 1 - De alcohol, die gebruikt wordt om het digitonine op te lossen (VII) moet zeer zuiver zijn, anders is de oplossing niet houdbaar.
- 2 - De oxydatieapparatuur (buizen en roerstaven) moet tevoren met heet chroomzuurmengsel zijn gereinigd en na zuivering met aqua bidest. worden gespoeld; de buizen droogt men in de droogstoof.
- 3 - Bij het reinigen van het choldig met heet water is drie-maal wassen in de regel ruim voldoende; het waswater mag de laatste maal geen spoor van schuimen meer vertonen.
- 4 - Bij de oxydatie mag de temperatuur niet boven 126° stijgen, daar anders te hoge uitkomsten zullen worden verkregen³³⁾; beneden 124° is de oxydatie te langzaam en dikwijls onvolledig.
- 5 - Wordt na het verzepen der esters vóór het wassen geheel drooggedampt, dan ontstaan dikwijls ontledingsproducten, die later niet meer in aether, alcohol of heet water in oplossing te brengen zijn en daardoor de uitkomsten foutief kunnen beïnvloeden.
- 6 - Dubbelbepalingen geven alleen zekerheid of de bewerking nauwkeurig is geschied.

Ijking van deze methode met zuivere cholesteroloplossingen.

'n Aantal mgr zuiver cholesterol (MERCK), dat gedurende 4 uur in een koolzuurstroom bij 110° tot constant gewicht was gedroogd, werden in een maatkolfje tot 100 cc in 96 %-ige alcohol opgelost.

Het cholesterol werd in 1 cc van deze oplossing bepaald op de wijze, als in het bovenstaande voorschrift werd beschreven.

TABEL II

1e reeks:

Ingewogen cholesterol:

160 mgr cholesterol

120 " "

200 " "

135 " "

Gevonden cholesterol:

158,3 mgr. cholesterol

118,7 " "

202,9 " "

135,1 " "

per 100 cc.

2e reeks:

Ingewogen cholesterol:

103,5 mgr.

140,7 mgr.

181,4 mgr.

208,0 mgr.

Gevonden cholesterol:

101,2 mgr.

105,7 "

102,0 "

137,0 "

138,1 "

143,6 "

137,6 "

178,1 "

183,7 "

188,9 "

205,7 "

201,4 "

204,2 "

201,6 "

209,9 "

202,1 "

Gemiddelde:

102,9 mgr.

139,0 mgr.

183,6 mgr.

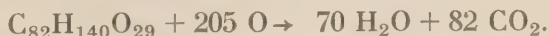
204,3 mgr.

Uit de verrichte contrôlebepalingen blijkt duidelijk, dat de bepalingsuitkomsten zeer bevredigend overeenstemmen met de ingewogen hoeveelheden cholesterol; bij de berekening van deze uitkomsten werd gebruik gemaakt van de theoretische vergelijking:

1 mgr cholesterol komt overeen met 10,65 cc 0,1 N

K-bichromaat.

De verbranding van het choldig blijkt dus inderdaad te verlopen volgens de vergelijking:



(Over de juistheid van de formule van het choldig zie Hoofdstuk V).

De in de berekening gebruikte factor 0,94157 (0,942 afgerond), die dus theoretisch werd afgeleid, gebruikt ook OKEY²⁶⁾. PETERS en v. SLIJKE nemen als factor 0,974 bij hun

berekeningen aan; deze is te hoog, doch zij rechtvaardigen zich door op te merken, dat het choldig niet altijd quantitatief tot CO_2 en H_2O wordt geoxydeerd en er verliezen kunnen optreden bij het reinigen van het neerslag. Omdat men over de graad van onnauwkeurigheid in deze bepaling geen zekerheid bezit, lijkt mij deze factorverandering ongewenst; in het ene geval heeft men grotere, in het andere kleinere hoeveelheden choldig te verwerken, in beide gevallen zal dus het verlies aan choldig in procenten niet hetzelfde zijn.

Contrôle van de bepaling in serum:

In een aantal gevallen werden de cholesterolfracties in serum bepaald met en zonder toevoeging van een bekende hoeveelheid cholesterol aan het serumextract.

TABEL III

mgr. Cholesterol per 100 cc serum:		32 mgr Cholesterol toegevoegd aan 100 cc serum:	
<i>vrij:</i>	<i>totaal:</i>	<i>vrij:</i>	<i>totaal:</i>
90,42	219,85	119,93	251,14
105,93	302,94	134,72	331,05
82,75	191,04	—	225,52
87,91	203,73	116,11	234,16
121,72	211,66	157,95	243,61
76,17	217,80	109,71	245,55
62,28	150,63	96,23	183,17

gemiddelde 31,70	{	29,51	31,29	{	gemiddelde 30,94
		28,79	28,11		
		—	34,48		
		28,20	30,43		
		36,23	31,95		
		33,54	27,75		
		33,95	32,54		

De voorgestelde methode blijkt dus alleszins bevredigende uitkomsten te geven, waardoor men vertrouwen mag hebben in de bepaling; alle genoemde waarden zijn uitkomsten van dubbelbepalingen, die binnen zeer enge grenzen kloppend waren.

Vergelijking tussen gravimetrische en oxydimetrische methode.

TABEL IV

mgr <i>vrij</i> cholesterol in 100 cc serum:		mgr <i>totaal</i> cholesterol in 100 cc serum:	
Gravimetrisch:	Oxydimetrisch:	Gravimetrisch:	Oxydimetrisch:
I {	56,3	55,4	187,2
	57,2	56,7	189,5
	57,6	56,9	—
II {	71,3	71,8	156,0
	71,9	70,9	158,1
	73,6	—	156,3
III {	91,8	92,5	214,0
	—	93,3	197,8
	90,7	91,7	216,3

De oxydimetrische methode, althans uitgevoerd volgens het voorschrift door mij gegeven, blijkt dus voor cholesterolonderzoeken in serum goed te voldoen en is in staat overeenstemmende resultaten te geven met de gravimetrische, die steeds voor de meest nauwkeurige methode werd aangezien.

Een nadeel van deze methodiek is haar grote bewerkelijkheid, die daardoor insluit dat slechts geoefende onderzoekers, die de analytische handelingen goed meester zijn, betrouwbare resultaten hiermede zullen kunnen verkrijgen.

LITERATUUR

- 1) I. BANG. „Verfahren zur titrimetrischen Mikrobestimmung der Lipoidstoffen”. *Bioch. Zschr.* 91-235-1918, 91-86-1918.
- 2) JOH. MAAS. „Zur Kritik der mikrochemischen Fett- und Cholesterinbestimmung nach I. BANG”. *Bioch. Zschr.* 144-379-1924.
- 3) W. BLOOR. „The determination of cholesterol in blood”. *J. biol. Chem.* 24-227-1916, 29-437-1917.
 W. BLOOR en A. KNUDSON. „The seperate determination of cholesterol and cholesterolesters in small amounts of blood”. *J. biol. Chem.* 27-106-1916.
 W. BLOOR. „The determination of small amounts of lipid in blood plasma”. *J. biol. Chem.* 77-53-1928.
 W. BLOOR. „The oxidative determination of phospholipid (lecithin and cephalin) in blood and tissues”. *J. biol. Chem.* 82-273-1929.
- 4) R. v. SZENT GYÖRGYI. „Die titrimetrische Mikrobestimmung von Cholesterin”. *Bioch. Zschr.* 136-112-1923.
- 5) M. NICLOUX. „Application à la détermination du carbone urinaire”. „Microdosage du carbone”. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 9-639-1927.
- 6) SIMON. *C. rend.* 170-514-1920, 170-734-1920, 174-1706-1922, 175-167-1922, 178-495-1924, 179-975-1924, 180-833-1925.
- 7) I. KOLTHOFF. „Die Maszanalyse”.
- 8) E. BRENNER, N. H. FURMAN, K. FAJANS en R. LANG. „Neuere masz-analytische Methoden”.
- 9) F. RAPPAPORT en H. ENGELBERG. *Klin. Woch.* 11-2080-1932.
 F. RAPPAPORT. „Mikrochemie des Blutes”.
- 10) Zie ⁸⁾.
- 11) J. ATANASIU. „Cerialze als Oxydationsmittel in der Elektrometrie”. *Bull. Chim. pur. et appl.* 30-73-1927.
- 12) H. WILLARD en PH. YOUNG. „Herstellung und Einstellung der Lösungen von Cerisulfat”. *J. Am. Chem. Soc.* 50-1322-1928.
- 13) N. FURMAN. *J. Am. Chem. Soc.* 50-755-1928, 51-1128-1929, 52-2347-1930, 53-1283-1931, 54-4235-1932.
- 14) N. FURMAN en J. WALLACE. *J. Am. Chem. Soc.* 52-1443-1930.
- 15) H. SNETHLAGE. „Die Aktivität der Schwefelsäure bei der Oxydation organischer Substanzen mit Chromsäure”. *Rec. trav. chim.* 53-567-1934, 54-651-1935.
- 16) TH. v. FELLEBERG. *Bioch. Zschr.* 188-365-1927.
- 17) FRANZ en LUTZE. *Ber.dtsch Chem. Ges.* 57-768-1924.

- 18) WHITE en HOLKEN. *Ind. Eng. Chem.* 17-83-1925.
- 19) W. STEPP. *Bioch. Zschr.* 87-135-1918.
- 20) J. DURAND. *Chem. Zentrbl.* 95-215-1924.
- 21) H. CORDEBARD. *Ann. Chim. Anal. Appl.* 3-49-1921.
- 22) SCHUTTE. *J. biol. Chem.* 61-57-1924.
- 23) A. WINDAUS. *Zschr. physiol. Chem.* 100-167-1917.
- 24) WILDE en LOCHTE. *J. Am. Chem. Soc.* 47-440-1925.
- 25) F. LAUERSEN en K. VOIT. „Zur Methodik der C-Bestimmung in biologischen Flüssigkeiten”. *Bioch. Zschr.* 280-276-1935.
- 26) R. OKEY. „Adaptation of the BLOOR oxidation procedure to the determination of small quantities of cholesterol as digitonid”. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 26-518-1929.
- 27) 28) A. HINRICHS en L. KLEMM. „Erfahrungen über die titrimetrische Mikrocholesterinbestimmung”. *Bioch. Zschr.* 210-191-1929.
- 29) H. FORSTER. *Bioch. Zschr.* 146-562-1924.
- 30) H. HEKSCHER en O. MÖLLER. *Skand. Arch. Physiol.* 52-222-1927.
- 31) M. TURNER. „A simplification of the OKEY method for the determination of cholesterol by oxidation of the digitonide”. *J. biol. Chem.* 92-495-1931.
- 32) M. YASUDA. „Contributions of the microdetermination of cholesterol”. *J. biol. Chem.* 92-303-1931.
- 33) G. MONASTERIO. „Die titrimetrische Mikrobestimmung des Cholesterins”. *Bioch. Zschr.* 265-444-1933.
- 34) T. OSUKA. „Halbmikromethode der Kohlenstoffbestimmung in biologischen Flüssigkeiten”. *Bioch. Zschr.* 244-284-1932.
- 35) H. KANITZ. „Nachtrag zur Halbmikromethode der Kohlenstoffbestimmung in biologischen Flüssigkeiten von T. OSUKA”. *Bioch. Zschr.* 257-361-1933.
- 36) SH. KATSURA en T. HATAKEYAMA. „Eine titrimetrische Bestimmungsmethode für Gesamtfettsäuren und des Cholesterols des Blutes”. *Bioch. Zschr.* 234-462-1931.
 SH. KATSURA, J. HATAKEYAMA en K. TAJIMA. „Eine titrimetrische Bestimmungsmethode von Blutphosphatiden. *Bioch. Zschr.* 257-22-1933.
 SH. KATSURA, T. HATAKEYAMA en K. TAJIMA. „Eine titrimetrische Bestimmungsmethode für kleine Mengen Phosphatiden, freies Cholesterin, Cholesterinester, Neutralfette und Gesamtlipoide des Blutes, des Blutplasmas und der Blutkörperchen”. *Bioch. Zschr.* 269-231-1934.
 SH. KATSURA, T. HATAKEYAMA en K. TAJIMA. *Bioch. Zschr.* 284-312-1936.
- 37) J. SCHEFFER. „Cholesterinbestimmungen in kleinen Gewebsmengen”. *Bratislav. lek. Lisky.* 11-41-1931.
- 38) E. BACKLIN. *Bioch. Zschr.* 217-482-1930.
- 39) E. FRÖLICHER en H. SÜLLMANN. „Die Veresterung von Cholesterin bei der Resorption aus dem Darm”. *Bioch. Zsch.* 274-21-1934.

D - DE NEPHELOMETRISCHE BEPALING VAN CHOLESTEROL

De te onderzoeken stof wordt in oplossing samengebracht met een digitonine-oplossing, waardoor een troebeling ontstaat; deze troebeling wordt in een nephelometer vergeleken met een troebeling, die men verkrijgt door aan een cholesterol-oplossing van bekende sterkte eveneens digitonine toe te voegen.

In een nephelometer wordt niet vergeleken met doorvallend licht zoals bij een colorimeter, doch met zijdelings invallend licht, waardoor het z.g. Tyndall-effect ontstaat, dat troebelings-vergelijking mogelijk maakt. Uit de verhouding van de vloeistofdikten van onbekende oplossing en standaard, kan men tot de hoeveelheid aanwezig cholesterol besluiten.

MÜHLBOCK, KAUFMANN en WOLFF ¹⁾ passen zulk een methode toe, waarover KRÖNER ²⁾ enige opmerkingen maakt.

De nephelometrische methode van MÜHLPFORDT ³⁾ heeft practisch geen toepassing gevonden.

BLOOR en FEX werkten beiden een nephelometrische bepaling uit voor vetten en lipoïden in serum; deze methode is door CSONKA ⁴⁾ nader bestudeerd en verbeterd, terwijl dezelfde onderzoeker zijn werkwijze daarenboven geschikt maakte om langs deze weg cholesterol in bloed te bepalen ⁵⁾.

LITERATUR

- 1) O. MÜHLBOCK, C. KAUFMANN en H. WOLFF. „Eine nephelometrische Mikromethode zur Bestimmung des Cholesterins”. *Bioch. Zschr.* 246-229-1933.
- 2) W. KRÖNER. „Einige Bemerkungen zur nephelometrischen Cholesterinbestimmung nach MÜHLBOCK, KAUFMANN und WOLFF”. *Bioch. Zsch.* 260-403-1933.
- 3) H. MÜHLPFORDT. „Zum Nachweis des Cholesterins”. *Derm. Woch.* 2-1651-1933.
- 4) F. CSONKA. „A study of the nephelometric values of cholesterol and the higher fatty acids”. *J. biol. Chem.* 34-577-1918.
- 5) F. CSONKA. „A study of the nephelometric values of cholesterol and the higher fatty acids”. *J. biol. Chem.* 41-243-1920.

E - DE BEPALING VAN CHOLESTEROL DOOR MIDDEL VAN EEN DIGITONINE-METHODE LANGS INDIRECTE WEG

De hieronder volgende bepalingmethode van de cholesterol-fracties in bloedserum is ontleend aan een mededeling van RAPPAPORT en KLAPHOLZ ¹⁾; zij bepalen cholesterol volgens een geheel nieuw principe.

„Het cholesterol wordt met een afgemeten hoeveelheid van een digitonineoplossing van bekende sterkte neergeslagen, afgefiltreerd en de overmaat digitonine na afsplitsing der hexosemoleculen titrimetrisch bepaald.”

Daartoe wordt het digitonine met verdund zwavelzuur gedurende 2 uur in een dampsterilisator bij 102° verhit; hierdoor treden geen concentratieveranderingen of waterverlies op. De vier in het digitonine aanwezige hexosemoleculen komen dan vrij. Na neutralisatie met natronloog wordt de hexose volgens FUJITA ²⁾ titrimetrisch bepaald. RAPPAPORT koos deze laatste methode en niet die van HAGEDORN en JENSEN, daar in deze de verbruikte hoeveelheid roodbloedloogzout niet direct met de reducerende suiker evenredig is. ³⁾

Daar RAPPAPORT bij zijn bepaling een druk-stoombad toepast en dit m.i. voor gewone klinische laboratoria bezwaarlijk is, heb ik een andere methode, op hetzelfde principe gebaseerd, uitgewerkt en wel als makromethode. Hiervan volgt dan nu de beschrijving.

§ 1 - Voorschrift voor een cholesterolbepaling in serum volgens een aftrekmethod.

Oplossingen:

I - Onteiwittvloeistof:

3 delen alcohol 96 % mengen met 1 deel aether; beide vloeistoffen werden eerst overgedestilleerd.

II - Digitonine-oplossing:

250 mgr digitonine (MERCK) lost men met alcohol van

van 96 % in een 50 cc maatkolf in een waterbad bij 80° op, koelt af, voegt 15 cc aqua dest. toe en vult met alcohol 96 % tot de streep aan.

III - *Alcohol 30 %.*

IV - *Zwavelzuur 40 %.*

V - *Natronloog 2 N.*

VI - *Alcoholische phenolphthaleïne-oplossing.*

VII - *Roodbloedloogzoutoplossing (gebufferd):*

a - 4,2 gr $K_3Fe(CN)_6$ (K.p.a.) oplossen tot 1 L.

b - 84,1 gr secundair K-phosphaat en 28,0 gr tertiair K-phosphaat samen oplossen tot 1 L.

Vóór gebruik 1 deel (a) mengen met 1 deel (b).

VIII - *Zn SO₄-Na Cl-KJ-oplossing:*

a - 10 gr Zn-sulfaat en 50 gr Na-chloride samen oplossen tot 160 cc,

b - 12,5 gr K-jodide oplossen in 100 cc aqua dest. en in bruine fles bewaren.

Vóór gebruik 4 delen (a) mengen met 1 deel (b).

Dit mengsel is hoogstens 5 dagen houdbaar; wanneer de oplossing (b) geelkleuring vertoont, wegwerpen! (Controleren met stijfseeloplossing).

IX - *Zoutzuur 2 N.*

X - *Stijfseeloplossing:*

1 gr oplosbaar zetmeel oplossen in 100 cc verzadigde Na-chlorideoplossing.

XI - *Thio ± 0,007 N:*

Deze oplossing uit thio 0,1 N. met uitgekookt aqua dest. bereiden; na een maand is de titer gestabiliseerd. In het begin telkens opnieuw de titer met K-jodaat stellen. (XII).

XII - *K-jodaat 0,01 N:*

0.1783 gr tot constant gewicht gedroogd KJO_3 (K.p.a.) tot 500 cc met aqua bidest. oplossen.

XIII - *Na-aethylaat-oplossing:*

2,5 gr zuiver, met aether gewassen, natrium in 100 cc

absolute alcohol onder afkoelen oplossen; in bruine fles goed afgesloten bewaren en bij bruinkleuring wegwerpen.

XIV - *Zoutzure alcohol:*

Absolute alcohol met droog zoutzuurgas verzadigd.

Stellen van de thio 0,007 N:

Pipetteer bij elkander:

2 cc (XII) en 2 cc (VIII) en 2 cc (IX) en
titreer het afgescheiden jodium met de te stellen thio.

Methode:

Voorbehandeling van het serum:

De winning van het *serumextract* geschiedt op volkomen dezelfde wijze als bij de oxydimetrische bepaling werd beschreven (hoofdstuk II C).

Blanco-digitoninebepaling:

a - Pipetteer 2 cc (II) in een 50 cc maatkolf en vul met (III) tot de maatsreep aan; meng en neem van deze oplossing 5 cc en breng deze in een pyrexbuis. Voeg nu 5 cc aqua dest. en 1 cc (IV) toe.

Plaats de buis in een kokend waterbad en hydrolyseer de inhoud twee uur; de buis wordt het eerste half uur open gelaten en de rest van de tijd met een dekseltje gesloten om overmatige verdamping tegen te gaan.

De titratie der vrijgekomen suikers wordt verder beschreven.

Stel voor terugtitratie nodig: X cc thio.

b - *Eigen reductie:*

Breng in eenzelfde pyrexbuis 5 cc (III), voeg 5 cc aqua dest. en 1 cc (IV) toe en „hydrolyseer” als boven.

Stel voor terugtitratie nodig: Y cc thio.

Door het aanwezige digitonine bij de blanco bepaling dus verbruikt:

Y—X cc thio.

BEPALING VRIJ CHOLESTEROL

a - *Neerslaan choldig:*

Pipetteer 10 cc serumextract in een bekersglas van 50 cc,

damp op een electrisch zandbad tot ± 2 cc in (neutraliseer zo nodig) en voeg toe 2 cc (II). Plaats nu het bekglas 10 min. op een waterbad, koel af en voeg 10 cc aqua dest. van 50° toe, waardoor het choldig quantitatief neerslaat. Laat het bekglas een nacht overstaan.

Filtratie choldig:

Spoel bekglas-inhoud in een 50 cc maatkolf met 30 %-ige alcohol en filtreer de inhoud door een zetmeelvrij vouwfilter in een droge kolf.

De verkregen vloeistof noemen we het:

„serumdigitonine-filtraat”.

Hydrolyse:

Van het filtraat nemen we 5 cc, voegen 5 cc aqua dest. toe en 1 cc (IV) en hydrolyseren het digitonine gedurende 2 uur in een kokend waterbad (zie blanco digitonine-bepaling).

Neutralisatie:

De buizen worden afgekoeld en de inhoud *nauwkeurig* genutraliseerd met (V) t.o.v. phenolphtaleïne (VI).

Oxydatie hexosen:

Na de neutralisatie toevoegen 5 cc mengsel (VII) en de buis 15 min. plaatsen in een kokend waterbad, waardoor oxydatie der hexosen plaats vindt.

Terugtitratie $K_3Fe(CN)_6$.

Koel de buis af, voeg 2 cc mengsel (VIII), 3 cc (IX) en 3 druppels stijfsel (X) toe. Titreer het afgescheiden jodium met thio 0,007 N. (XI) uit een micro-buret tot juist kleurloos.

Stel nodig voor terugtitratie: V cc thio.

b - Eigen reductie:

Pipetteer in een buis 1 cc serumextract, 4 cc (III), 5 cc aqua dest. en 1 cc (IV) en „hydrolyseer” als boven werd beschreven.

Bepaal nu hierin het reductievermogen als onder de bepaling van vrij cholesterol werd aangegeven.

Stel nodig voor terugtitratie: Z cc thio.

Het digitonine, dat door het cholesterol was gebonden, verbruikte dus:

Z—V cc thio.

Berekening vrij cholesterol:

$$\left\{ (Y-X) - (Z-V) \right\} \times \frac{T_{\text{thio}}}{0.005} \times 0,115 \times \frac{100}{0.1} \text{ mgr}$$

vrij cholesterol per 100 cc serum.

T_{thio} = titer der gebruikte thio-oplossing.

0,115 = factor van RAPPAPORT en KLAPHOLZ¹⁾, n.l.

1 cc $K_3Fe(CN)_6$ 0,005 N = 0,115 mgr cholesterol.

Korter:

$$\left\{ (Y-X) - (Z-V) \right\} \times T_{\text{thio}} \times 23000 = \text{mgr vrij cholesterol in}$$

100 cc serum.

BEPALING TOTAAL CHOLESTEROL

a - Verzeping cholesterolsters:

Pipetteer 5 cc serumextract in een kolfje met aangeslepen luchtkoeler (kooksteentjes); de aether wordt eerst uit het open kolfje op een electrisch zandbad weggedampt en dan 2 cc (XIII) toegevoegd. Duur der verzeping onder zacht koken een uur met opgezette koeler op een electrisch zandbad.

Neutraliseren en filtreren:

Kolfje afkoelen en de inhoud neutraliseren met (XIV) met phenolphthaleïne (VI); na afkoelen 3 cc absolute aether toevoegen en de vloeistof filtreren door een platfilter in een bekersglas van 50 cc onder driemaal naspoelen van kolfje en filter met telkens ± 3 cc aether.

Indampen en bepaling:

Damp op een electrisch zandbad de bekersglas-inhoud tot ± 2 cc af en handel na het toevoegen van digitonine op volkomen dezelfde wijze als voor de bepaling van vrij cholesterol werd beschreven.

Stel voor terugtitratie nodig: *U cc thio.*

b - Eigen reductie:

Neem 2 cc (XIII), 5 cc serumextract en verzeep als boven. Neutraliseer, filtreer en damp als boven in; spoel het ingedampde filtraat met (III) in een 50 cc maatkolf.

Neem van deze vloeistof 5 cc, voeg 5 cc aqua dest. en 1 cc (IV) toe; plaats nu de buis twee uur in een kokend waterbad en handel verder als voor de bepaling van vrij cholesterol werd aangegeven.

Stel voor terugtitratie nodig: *W cc thio.*

Berekening totaal cholesterol.

$$\left\{ (Y-X) - (W-U) \right\} \times \frac{T_{\text{thio}}}{0.005} \times 0,115 \times \frac{100}{0,05} \text{ mgr}$$

totaal cholesterol per 100 cc serum.

Korter:

$$\left\{ (Y-X) - (W-U) \right\} \times T_{\text{thio}} \times 46000 \text{ mgr}$$

totaal cholesterol per 100 cc serum.

Berekening veresterd cholesterol:

Deze is te berekenen door de hoeveelheid totaal cholesterol te verminderen met de vrije hoeveelheid.

Opmerkingen:

- 1 - Indien de roodbloedloozout-oplossing (VII) met phosphaat gebufferd is, is de verbruikte hoeveelheid recht evenredig met de aanwezige hexose.
- 2 - De gebruikte pyrexbuizen hebben een lengte van 20 cm en een doorsnede van 2 cm.
- 3 - In plaats van 2 uur is een hydrolyse-tijd van 1½ uur eveneens voldoende.
- 4 - De buizen worden in het begin van de hydrolyse open-gelaten om de alcohol gelegenheid te geven te verdampen.
- 5 - Indien men geen „eigen reducties” bepaalt, vindt men geen kloppende uitkomsten.
- 6 - Bij het neutraliseren van digitonine-oplossingen moet men nauwkeurig te werk gaan, daar digitonine in alkalisch milieu onoplosbaar is.
- 7 - De factor van RAPPAPORT:
 $1 \text{ cc } K_3Fe(CN)_6 \text{ 0,005 N} = 0,115 \text{ mgr cholesterol,}$
 heb ik gecontroleerd en juist bevonden.
- 8 - De alcohol, die bij de bepaling gebruikt wordt, zowel als die waarin digitonine wordt opgelost, moet zeer zuiver zijn; de alcohol van de handel is hiervoor niet direct bruikbaar, doch moet met zorg tweemaal worden over-gedestilleerd. Hierbij werpe men van elke L. de eerste 50 cc destillaat weg en laat de temperatuur niet boven 80° stijgen.
- 9 - FLATOW⁴⁾ merkt een en ander op over de bestendigheid

van oplossingen van roodbloedloogzout (VII), dat de aandacht verdient.

Contrôle van bovenstaand voorschrift.

Aan serumextracten van patiënten werd een bekende hoeveelheid cholesterol toegevoegd en nu het vrije- zowel als het totale cholesterol bepaald.

TABEL V

Mgr cholesterol per 100 cc serum		40 mgr. cholesterol, toegevoegd aan 100 cc serum	
<i>vrij:</i>	<i>totaal:</i>	<i>vrij:</i>	<i>totaal:</i>
50,8	124,3	94,8	165,1
66,4	187,9	105,3	231,0
81,7	211,9	124,0	253,2
73,6	197,4	114,8	238,3
90,2	226,2	132,3	264,9

gemiddelde 41,7	{	44,0	40,8	{	gemiddelde 40,96
		38,9	43,1		
		42,3	41,3		
		41,2	40,9		
		42,1	38,7		

De toegevoegde hoeveelheid cholesterol wordt dus, zowel bij de bepaling van het vrije- als van het totale cholesterol, op enkele procenten na teruggevonden.

Alhoewel de gegeven methode niet eenvoudig in de uitvoering is en nauwkeurig werken vereist, blijkt zij dus zeer wel bruikbaar te zijn.

Vergelijking tussen gravimetrische en de bovengegeven titrimetrische methode.

TABEL VI

Mgr vrij cholesterol in 100 cc serum		Mgr totaal cholesterol in 100 cc serum	
<i>Gravimetrisch:</i>	<i>Titrimetrisch:</i>	<i>Gravimetrisch:</i>	<i>Titrimetrisch:</i>
74,6	75,9	184,0	186,0
50,2	50,73	126,0	128,6
36,9	38,1	151,8	151,9
81,1	82,6	211,2	212,3

§ 2 - Kan choldig zelf ook gehydrolyseerd worden?

Toen de bovenvermelde titrimetrische methode was uitgewerkt, heb ik mij afgevraagd of het mogelijk zou zijn het choldig zelf aan hydrolyse te onderwerpen en de dan wellicht eveneens vrijkomende hexosemoleculen te bepalen.

Door mij werd dit onderzoek ingesteld deels in de hoop de zo juist beschreven bepaling te vereenvoudigen, deels om een reden, die buiten het bestek van dit proefschrift valt. Wanneer het onderstelde n.l. mogelijk zou zijn, dan zou men zich hiermede een mogelijkheid geschapen hebben om na te gaan of digitonine aan choldig wordt geadsorbeerd en in welke mate. Het bedoelde onderzoek leverde gunstige resultaten op en ik hoop later het vermelde vraagpunt nader te kunnen uitwerken.

Voor dit doel werd uitgegaan van vers bereide alcoholische oplossingen van zuiver cholesterol en digitonine (MERCK). Het neergeslagen choldig werd nauwkeurig gereinigd op de wijze, die uitvoerig bij de oxydimetrische bepaling beschreven staat. (hoofdstuk II C).

Na de laatste wassing met heet water, werd 2 cc aqua dest. en 2 cc 40 %-ig zwavelzuur toegevoegd. Dit mengsel werd gedurende enige tijd in een kokend waterbad verhit, om splitsing van het gebonden digitonine te bewerkstelligen, en daarna werden de in vrijheid gestelde hexosen volgens de methode van FUJITA en IWATAKE titrimetrisch bepaald.

Bij de berekening werd voorlopig van de factor

$$1 \text{ cc } K_3 \text{ Fe(CN)}_6 \text{ 0,005 N} = 0,115 \text{ mgr cholesterol}$$

gebruik gemaakt, alhoewel voor mij de juistheid hiervan nog niet vaststond.

TABEL VII

<i>Hydrolysetijd:</i>	<i>Cholesterol berekend:</i>	<i>Cholesterol gevonden:</i>
1 uur	0,3 mgr	0,239 mgr
1 „	0,3 „	0,241 „
2 „	0,3 „	0,256 „
2 „	0,3 „	0,271 „
3 „	0,3 „	0,321 „
3 „	0,3 „	0,351 „
3 „	0,3 „	0,408 „

De resultaten overziende, was dit begin niet bemoedigend; er bleek uit, dat:

- 1 - de hydrolysetijd een grote rol speelt,
- 2 - hoe langer de hydrolyse duurt, des te meer cholesterol wordt gevonden, zelfs waarden, die volkomen onjuist zijn.

Wat het onder (1) waargenomene betreft: het choldig, dat zich in de centrifugeerbuis, na gereinigd te zijn, in vrij compacte toestand bevindt, zal moeilijk gehydrolyseerd kunnen worden. De inwerking van het splitsende zuur zal afhankelijk zijn van de verdelingsgraad van het choldig.

Men kan zich voorstellen, dat, indien het neerslag fijn verdeeld aanwezig is, in dezelfde tijd meer hexose zal worden vrijgemaakt, dan wanneer de verdeling grof is. Wat punt (2) aangaat, zou men zo oppervlakkig zeggen, dat de factor van RAPPAPORT in dit geval niet opgaat.

Nu werd een andere weg gevolgd; het in de centrifugeerbuis aanwezige choldig werd in een stoof drooggedampt en dan 3 cc absolute alcohol toegevoegd, waardoor het oploste. Aan deze oplossing voegde ik toe $1\frac{1}{2}$ tot 2 cc zwavelzuur 40 % en 2 cc water; hierdoor sloeg het choldig in zeer fijn verdeelde toestand neer en kon nu beter door het zuur worden aangegrepen; tegelijkertijd werd de duur der hydrolyse constant gehouden voor de gehele reeks.

TABEL IX		
<i>Hydrolysetijd:</i>	<i>Cholesterol berekend:</i>	1 cc $K_3 Fe(CN)_6$ 0,005 N <i>komt overeen met:</i>
{ 2 uur	0,08 mgr	0,094 mgr cholesterol
{ 2 „	0,08 „	0,095 „ „
{ 2 „	0,08 „	0,094 „ „
{ 2 „	0,16 „	0,152 „ „
{ 2 „	0,16 „	0,158 „ „
{ 2 „	0,16 „	0,149 „ „
{ 2 „	0,20 „	0,168 „ „
{ 2 „	0,20 „	0,163 „ „
{ 2 „	0,20 „	0,167 „ „

De nieuwe factor, die wij berekenen konden uit de verbruikte hoeveelheden roodbloedloogzout, stemde absoluut niet met die van RAPPAPORT overeen, alhoewel bij dezelfde hoeveelheden cholesterol de waarden vrijwel overeenstemden.

Het choldigneerslag, dat zich bij de toevoeging van het

water en het zuur aan de alcoholische oplossing inderdaad in zeer fijn verdeelde toestand afscheidde, pakt echter na korte tijd samen; in het geval dat weinig cholesterol aanwezig is, zal de grootte der deeltjes verschillen met die, wanneer veel choldig te hydrolyseren valt. Alhoewel een kleine vooruitgang bleek waar te nemen, is de hydrolyse voor verschillende hoeveelheden choldig nog totaal onbevredigend.

Toen werd door mij de vraag gesteld of het cholesterol mischien zelf door het aanwezige zuur een verandering ondergaat, waardoor producten ontstaan, die roodbloedloogzout eveneens reduceren.

Om dit na te gaan werden verschillende hoeveelheden cholesterol aan de inwerking van zuren, in diverse concentratie, bij hogere temperaturen blootgesteld en daarna langs oxydometrische weg bepaald.

TABEL X

Cholesterol ingewogen	Gevonden na 2 uur verwarmen met		
per cc:	H ₂ SO ₄ 40 %:	H ₂ SO ₄ 20 %:	H CI 15 %:
0,1 mgr	0,103 mgr	0,103 mgr	0,101 mgr
0,1 „	0,101 „	0,103 „	0,107 „
0,12 „	0,123 „	0,121 „	0,127 „
0,12 „	0,123 „	0,119 „	0,119 „
0,20 „	0,210 „	0,205 „	0,210 „
0,40 „	0,407 „	0,403 „	0,408 „
0,40 „	0,405 „	0,410 „	0,400 „
0,50 „	0,501 „	0,503 „	0,507 „
0,60 „	0,610 „	0,603 „	0,610 „
0,60 „	0,612 „	0,603 „	0,600 „
1,00 „	1,010 „	0,998 „	1,010 „

Uit bovenstaande tabel blijkt dat het cholesterol bij verwarmen met zuur *geen* verandering ondergaat; deze zuurbehandeling kan dus de onbevredigende uitkomsten, hierboven medegedeeld, niet verklaren.

Een tweede vraag was: Levert de gebruikte alcohol, die tevoren door destilleren gereinigd is, bij koken met zuur producten op, die reductievermogen bezitten.

Dit wordt op de volgende wijze gecontroleerd:

3 cc absolute alcohol brengt men in een pyrexhuis; na toevoegen van aqua dest. wordt de alcohol gekookt met 1½ cc zwavelzuur 40 %, waarna het reductievermogen van de vloeis-

stof t.o.v. de bekende roodbloedloogzout-oplossing wordt bepaald.

TABEL XI

cc thio nodig voor de terugtitratie:

<i>blanco:</i>	<i>1 uur:</i>	<i>2 uur:</i>	<i>3 uur (koken met zuur):</i>
3,51 cc	3,40 cc	3,40 cc	3,39 cc
3,51 „	3,41 „	3,41 „	3,40 „
3,50 „	3,41 „	3,40 „	3,44 „

Het maakt dus geen verschil of de alcohol korter of langer met zwavelzuur verwarmd wordt; reducerende stoffen ontstaan dus blijkbaar hierbij niet.

Bij het critisch bezien van de gevolgde bepalingswijze viel het mij op, dat bij de bepaling van verschillende hoeveelheden choldig het vloeistofvolume, waarin de oxydatie van de hexosen na hydrolyse plaats vond, niet hetzelfde was.

Allereerst werd door mij aan zuivere glucose-oplossingen nagegaan of het totaal volume op de bepaling volgens FUJITA-IWATAKE van invloed was.

TABEL XII

Hoeveelheid glucose:	Totaal volume:	Glucose teruggevonden:
1 mgr	20 cc	0,89 mgr
1 „	20 „	0,91 „
1 „	30 „	0,88 „
1 „	30 „	0,85 „
1 „	40 „	0,79 „
1 „	40 „	0,76 „
1 „	10 „	0,96 „
1 „	10 „	0,97 „

Bij de oxydatie met de gebufferde $K_3Fe(CN)_6$ -oplossing werd gedurende 15 min. in een kokend waterbad verwarmd; uit bovenstaande tabel blijkt, dat het vloeistofvolume bij de oxydatie geen onbetekenende rol speelt. Grotere hoeveelheden vloeistof hebben natuurlijk een langere tijd nodig om tot een bepaalde temperatuur te komen dan kleinere.

De bepaling werd met het oog op de uitslag van deze contrôle als volgt gewijzigd:

Na 2 uur hydrolyse van het choldig met zwavelzuur werd de oplossing in de centrifugeerbuis geneutraliseerd met sterke natronloog, druppelsgewijze met een fijne glascapillair. In dezelfde centrifugeerbuis werd nu de oxydatie van de hexosen met roodbloedloogzout gedurende 15 min. in een kokend waterbad uitgevoerd. Het resultaat van deze proevenreeks sprak voor zich zelf.

TABEL XIII

Ingewogen cholesterol:	Gevonden mgr cholesterol, die overeenkomen met 1 cc $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0,005 N:	
0,16 mgr	0,175 mgr	} $\pm 0,177$ mgr
0,16 „	0,176 „	
0,16 „	0,172 „	
0,16 „	0,181 „	
0,24 „	0,175 „	} $\pm 0,176$ mgr
0,24 „	0,176 „	
0,24 „	0,176 „	
0,32 „	0,183 „	} $\pm 0,176$ mgr
0,32 „	0,167 „	
0,32 „	0,189 „	
0,32 „	0,170 „	

De uitkomsten der bepaling bleken onafhankelijk te zijn geworden van de bepaalde hoeveelheid cholesterol, alhoewel de gevonden factor

1 cc 0,005 N $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 = 0,176$ mgr cholesterol
absoluut niet overeenstemde met die van RAPPAPORT

1 cc 0,005 N $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 = 0,115$ mgr cholesterol.

In een nieuwe reeks van bepalingen werd op de hierna-volgende manier de methode gewijzigd en tevens de hydrolyse-tijd gevarieerd.

Het neergeslagen choldig werd door een filter (Sch. 589) gefiltreerd en door middel van telkens ongeveer 5 cc kokend water viermaal gewassen; filter en neerslag werden nu in een stoof bij 105° gedroogd. Dit droge neerslag loste ik nauwkeurig in absolute alcohol op, en wel in totaal 7,5 cc, voegde 3 cc aqua dest. en 2 cc 40 %-ig zwavelzuur toe en hydrolyseerde verschillende tijden.

TABEL XIV

Ingewogen cholesterol:	Hydrolyse- tijd:	1 cc $K_3Fe(CN)_6$ 0,005 N komt overeen met:
0,16 mgr	1,5 uur	0,248 mgr cholesterol
0,16 „	1,5 „	0,274 „ „
0,16 „	1,5 „	0,274 „ „
0,16 „	2,25 „	0,221 „ „
0,16 „	2,25 „	0,228 „ „
0,16 „	2,25 „	0,208 „ „
0,16 „	1,75 „	0,224 „ „
0,16 „	1,75 „	0,187 „ „
0,16 „	1,75 „	0,216 „ „
0,32 „	1,75 „	0,294 „ „
0,32 „	1,75 „	0,286 „ „
0,32 „	1,75 „	0,307 „ „
0,32 „	2,00 „	0,307 „ „
0,32 „	2,00 „	0,439 „ „
0,32 „	2,00 „	0,352 „ „
0,64 „	2,00 „	0,383 „ „
0,64 „	2,00 „	0,334 „ „
0,64 „	2,00 „	0,359 „ „
0,64 „	3,00 „	0,273 „ „
0,64 „	3,00 „	0,269 „ „
0,64 „	3,00 „	0,260 „ „

Bij bepaling van verschillende hoeveelheden cholesterol werden op de eerste plaats verschillende reductiefactoren gevonden, wat een achteruitgang in vergelijking met de vorige reeks betekende, maar daarenboven was de hydrolyseduur van grote invloed op het resultaat.

Alhoewel de uitkomsten van bovenstaande proeven niet zeer bemoedigend waren, ben ik met het onderzoek voortgegaan en heb ik mij zelf afgevraagd of het mogelijk zou zijn het choldig in *opgeloste* toestand aan hydrolyse te onderwerpen, daar het neerslaan van deze stof uit de alcoholische oplossing als het riskante moment in de bepaling aangezien moet worden.

De verdelingsgraad van het choldig in de vloeistof is m.i. de grote oorzaak of de hydrolyse van het choldig min of meer volledig zal uitvallen.

In de volgende reeksen van proeven werd na filtratie en reiniging van het choldig in de centrifugeerbuis het neerslag wederom in absolute alcohol opgelost; nu werd echter niet

afgedampt, maar aanstonds in plaats van zwavelzuur een kleine hoeveelheid (1,5 cc) sterk *zoutzuur* toegevoegd. Het *zoutzuur* lost gemakkelijk in de alcoholische vloeistof op, zonder dat het choldig neerslaat. Indien men nu verwarmt, heeft de hydrolyse in een *ware* oplossing plaats, zodat de dispersiteit geen rol speelt.

De hydrolyse liet ik plaatsvinden in een gewone reageerbuis op een elektrische stoof zonder koeler; na het koken met *zoutzuur* werd in een waterbad (na toevoegen van aqua dest.) de alcohol volledig afgedampt en de afgescheiden hexosen volgens FUJITA-IWATAKE bepaald.

TABEL XV

Cholesterol ingewogen:	Hydrolyse- tijd:	1 cc $K_3Fe(CN)_6$ 0,005 N komt overeen met:
{ 0,08 mgr	0,75 uur	0,113 mgr cholesterol
{ 0,08 „	0,75 „	0,116 „ „
{ 0,08 „	0,75 „	0,121 „ „
{ 0,16 „	0,50 „	0,126 „ „
{ 0,16 „	0,50 „	0,116 „ „
{ 0,16 „	0,50 „	0,114 „ „
{ 0,32 „	0,50 „	0,115 „ „
{ 0,32 „	0,50 „	0,115 „ „
{ 0,32 „	0,50 „	0,121 „ „
{ 0,32 „	1,00 „	0,121 „ „
{ 0,32 „	1,00 „	0,122 „ „
{ 0,32 „	1,00 „	0,113 „ „
{ 0,32 „	1,50 „	0,110 „ „
{ 0,32 „	1,50 „	0,114 „ „
{ 0,32 „	1,50 „	0,114 „ „
{ 0,32 „	2,00 „	0,113 „ „
{ 0,32 „	2,00 „	0,117 „ „
{ 0,32 „	2,00 „	0,115 „ „
{ 0,32 „	2,50 „	0,117 „ „
{ 0,32 „	2,50 „	0,120 „ „
{ 0,32 „	2,50 „	0,116 „ „
{ 0,32 „	3,00 „	0,127 „ „
{ 0,32 „	3,00 „	0,116 „ „
{ 0,32 „	3,00 „	0,116 „ „
{ 0,48 „	1,00 „	0,116 „ „
{ 0,48 „	1,00 „	0,116 „ „
{ 0,48 „	1,00 „	0,111 „ „

Cholesterol ingewogen:	Hydrolyse- tijd:	1 cc $K_3Fe(CN)_6$ 0,005 N komt overeen met:
{ 0,48 uur	2,00 uur	0,117 mgr cholesterol
{ 0,48 „	2,00 „	0,118 „ „
{ 0,48 „	2,00 „	0,115 „ „
{ 0,48 „	3,00 „	0,114 „ „
{ 0,48 „	3,00 „	0,115 „ „
{ 0,48 „	3,00 „	0,117 „ „
{ 0,64 „	1,00 „	0,117 „ „
{ 0,64 „	1,00 „	0,117 „ „
{ 0,64 „	1,00 „	0,115 „ „

Inderdaad blijkt dus volgens bovenstaande uitkomsten deze gewijzigde methode goede resultaten op te leveren; op de eerste plaats liggen de factor-waarden voor de verschillende concentraties van cholesterol dicht bij elkander en stemmen overeen met de factor van RAPPAPORT:

$0,115 \text{ mgr cholesterol} = 1 \text{ cc } K_3Fe(CN)_6 \text{ } 0,005 \text{ N.}$,
maar op de tweede plaats valt hieruit de conclusie te trekken, dat zoutzuur sneller de splitsing van het choldig volvoert dan zwavelzuur. Het maakt n.l. practisch geen verschil of de hydrolysetijd kort of lang is, of veel of weinig choldig gesplitst moet worden; $\pm$ een uur verwarmen met zoutzuur blijkt ruim voldoende te zijn.

Bij onbemerkt te ver afdampen van de kokende vloeistof bestaat daarenboven geen gevaar, dat de bepaling als verloren moet worden beschouwd; zoutzuur werkt ook in hoge concentraties niet oxyderend, hetgeen zwavelzuur wel doet, terwijl tevens verkoling kan optreden. Een zoutzuuroplossing in absolute alcohol is niet te gebruiken, daar in dit geval de hoeveelheid water, die toch de eigenlijke „verzeping” moet uitvoeren, te gering zou zijn; teveel water stoort, daar in verdunde alcohol het choldig onoplosbaar is en uitvlokt; te weinig water eveneens, daar dan in niet voldoende mate het hydrolyse-evenwicht naar de kant van de verzepingsproducten (hexosen o.a.) verschoven wordt. Dit kan men zien, indien men de vermoedelijke evenwichtsconstante hiervoor opschrijft:

$$K = \frac{C_{\text{choldig}} \times C_{\text{water}}}{C_{\text{cholesterol}} \times C_{\text{hexose}}^4 \times C_{\text{digitogenine}} \times C_{\text{pentose}}}$$

In bovengenoemde proevenreeks werden wisselende hoe-

veelheden cholesterol bepaald, doch met dien verstande dat bij elke bepaalde hoeveelheid cholesterol een in procenten dezelfde overmaat digitonine aangewend werd om het choldig neer te slaan.

Om echter uit te maken of de besproken bepalingsmethode geschikt is om cholesterol in serum te bepalen, moet men proefondervindelijk nagaan of met *eenzelfde* hoeveelheid digitonine, mits in overmaat, allerlei hoeveelheden cholesterol kunnen worden gevonden; daarvoor heb ik een nieuwe reeks proeven gedaan aan zuivere cholesteroloplossingen van verschillende concentratie en daaraan zoveel digitonine toegevoegd, dat zeker een voldoende overmaat van deze stof aanwezig was.

TABEL XVI

Cholesterol ingewogen:	Hoeveelheid digitonine:	Hydrolyse- tijd:	1 cc $K_3Fe(CN)_6$ 0,005 N komt overeen met:
0,16 mgr/cc	1 cc 1 %	1 uur	0,110 mgr cholesterol
0,16 "	1 " "	1 "	0,120 * " "
0,16 "	1 " "	1 "	0,113 " "
0,32 "	1 " "	1 "	0,120 * " "
0,32 "	1 " "	1 "	0,113 " "
0,32 "	1 " "	1 "	0,120 " "
0,40 "	1 " "	1 "	0,123 * " "
0,40 "	1 " "	1 "	0,115 " "
0,40 "	1 " "	1 "	0,117 " "
0,60 "	1 " "	1 "	0,111 " "
0,60 "	1 " "	1 "	0,116 " "
0,60 "	1 " "	1 "	0,121 * " "
0,64 "	1 " "	1 "	0,113 " "
0,64 "	1 " "	1 "	0,114 " "
0,64 "	1 " "	1 "	0,117 " "

Conclusie:

Laten we enkele zeer hoge waarden(*) buiten beschouwing, die zeer waarschijnlijk op onnauwkeurigheden bij de analyses berusten, dan vindt men een goede overeenkomst met de factor van RAPPAPORT:

$$(0,115 - 0,117) \text{ mgr cholesterol} = 1 \text{ cc } K_3Fe(CN)_6 \text{ 0,005 N.}$$

De directe hydrolyse van het choldig geeft dus evenzo

nauwkeurige uitkomsten als de methode, die op bepaling langs indirecte weg berust, n.l. van het digitonine, dat door het cholesterol gebonden werd.

In aansluiting hiermede heb ik een methode uitgewerkt om langs deze weg het vrije- zowel als het totale cholesterol in bloed te bepalen; zij is eenvoudiger en zekerder in de uitvoering dan die, welke hiervoor beschreven werd.

§ 3 - *Voorschrift voor een cholesterolbepaling in serum door directe hydrolyse van choldig.*

Oplossingen:

I - *Onteiwitvloeistof:*

3 delen alcohol 96 % mengen met 1 deel aether; beide vloeistoffen tevoren overdestilleren.

II - *Digitonine-oplossing:*

1 gram digitonine (MERCK) oplossen in 100 cc alcohol 96 % (niet meer dan 100 cc in voorraad bewaren).

III - *Alizarinegeel-oplossing:*

0,1 gr alizarinegeel in 100 cc aqua dest.

IV - *Natronloog:*

± 50 % oplossing.

V - *Roodbloedloogzout-oplossing:*

a - 4,2 gr $K_3Fe(CN)_6$ (K.p.a.) oplossen tot 1 L.

b - 84,1 gr secundair K-phosphaat en 28,0 gr tertiair K-phosphaat samen oplossen tot 1 L.

Vóór gebruik 1 deel (a) mengen met 1 deel (b).

VI - *$ZnSO_4-NaCl-KJ$ oplossing:*

a - 10 gr Zn-sulfaat,

50 gr Na Cl samen oplossen tot 160 cc.

b - 12,5 gr K-jodide oplossen tot 100 cc en in een bruine fles goed afgesloten bewaren (controleren met stijfseleplossing).

Vóór gebruik 4 delen (a) mengen met 1 deel (b).

Dit mengsel is hoogstens 5 dagen houdbaar!

VII - *Zoutzuur 2 N.*

VIII - *Stijfseloplossing*:

1 gr oplosbaar zetmeel oplossen in 100 cc verzadigde Na-chloride-oplossing.

IX - *Thio 0,007 N* (zie aftrekmethode).X - *Na-aethylaatoplossing*:

2,5 gr zuiver natrium, in aether gewassen, onder afkoelen in 100 cc absolute alcohol oplossen; deze oplossing in bruine fles goed afgesloten bewaren.

XI - *Zoutzure alcohol*:

Absolute alcohol met droog zoutzuurgas verzadigd.

XII - *K-bichromaat 0,01 N*:

0,24518 gr droog, gepoederd K-bichromaat (K.p.a.) tot 500 cc in aqua dest. oplossen; deze oplossing dient om de thio te stellen.

XIII - *Alcoholische phenolphtaleïne-oplossing*:

Verder is voor deze bepaling nodig:

vetvrije aether,	absolute alcohol,
absolute aether,	zoutzuur 37 %.

Stellen thio 0,007 N:

Pipetteer in een pyrexbuis

2 cc (XII), 2 cc (VI) en 2 cc (VII)

en titreer het afgescheiden jodium met de te stellen thio.

Bereiding serumextract:

Zie hiervoor de oxydimetrische bepaling (hoofdstuk II C) (te nemen 2 cc serum en onteiwitten tot 25 cc).

BEPALING VRIJ CHOLESTEROL

a - Neerslaan choldig:

Pipetteer 5 cc serumextract (0,4 cc serum) in een bekeerglas van 25 cc, damp op een electrisch zandbad tot $\pm$ 2 cc af en voeg toe 1 cc (II). Damp nu verder in tot 2 cc en laat overnacht staan.

b - Filtratie choldig:

Neerslag en vloeistof uit het bekerglas spoelt men op een filter (Sch.) van 7 cM, dat tevoren met heet water gereinigd is; men spoelt met kokend water, waardoor tevens de overmaat digitonine weggewassen wordt. Trechter en filter worden nu in een stoof bij $\pm 105^\circ$ gedroogd en vervolgens behandeld met ± 10 cc vetvrije aether; na opnieuw verwarmen om de aether te verwijderen, wordt het neerslag op het nog hete filter opgelost in hete absolute alcohol. Dit oplossen doet men het eenvoudigst met een zelf gemaakte 0,5 cc pipet met fijne punt; in totaal wordt voor dit oplossen ongeveer 10 cc alcohol gebruikt.

c - Hydrolyse choldig:

De choldigoplossing, die zich nu in een gewone reageerbuis bevindt, met kooksteen, kookt men nu een uur op een electrisch zandbad, nadat 1,5 cc 37 %-ig zoutzuur is toegevoegd.

d - Afdampen alcohol:

De hydrolysebuizen plaatst men hiervoor in een kokend waterbad tot de laatste rest alcohol verdwenen is; onderwijl heeft men 3 cc aqua dest. toegevoegd.

e - Neutralisatie:

De buizen worden afgekoeld en de inhoud geneutraliseerd t.o.v. alizarinegeel met loog (IV); hiervoor wordt een capillair buisje gebruikt, daar het van groot belang is dat de vloeistof juist neutraal wordt.

f - Oxydatie hexosen:

In dezelfde buizen pipetteert men nu 5 cc (V) en plaatst de buizen nu 15 min. in een kokend waterbad.

g - Terugtitratie:

Koel de buizen af, voeg toe 2 cc (VI), 3 cc (VII) en 3 druppels stijfsel (VIII). Titreer het afgescheiden jodium met thio (IX) uit een microburet tot juist kleurloos.

h - Blanco bepaling:

Deze wordt op dezelfde wijze uitgevoerd met dien verstande, dat geen choldigoplossing wordt gebruikt, maar 10 cc absolute alcohol, dus vanaf (b).

Berekening vrij cholesterol:

mgr cholesterol in 100 cc serum:

$$(x - y) \times \frac{T_{\text{thio}}}{0,005} \times 0,115 \times \frac{100}{0,4};$$

x = cc thio voor terugtitratie blanco (h),

y = cc thio voor terugtitratie bepaling (g),

T_{thio} = titer thio oplossing.

0,115 = factor van RAPPAPORT.

Korter:

mgr. cholesterol in 100 cc serum = $(x - y) \times T_{\text{thio}} \times 5750$.

BEPALING TOTAAL CHOLESTEROL

a - Verzeeping cholesterol-esters:

Pipetteer 2 cc serumextract (0,16 cc serum) in een reageerbuis, met kooksteen. Damp eerst de aether op een electrisch zandbad weg en voeg dan 2 cc (X) toe.

De verzeeping laat men plaats hebben onder voorzichtig koken gedurende een uur, echter zó, dat zo weinig mogelijk alcohol verdampt.

b - Neutralisatie en filtratie:

De reageerbuis wordt afgekoeld en de inhoud geneutraliseerd met (XI) t.o.v. phenolphthaleïne (XIII); na opnieuw afgekoeld te hebben, voegt men 3 cc absolute aether toe en filtreert door een platfilter in een bekerglas van 25 cc, terwijl buis en filter driemaal worden nagespoeld met telkens ± 3 cc aether.

c - Indampen en bepaling:

Damp de inhoud van het bekerglas op een electrisch zandbad tot ongeveer 2 cc in en sla het cholesterol op dezelfde wijze neer als boven voor vrij cholesterol beschreven werd.

De bepaling zelf is nu volkomen gelijk aan bovenstaand voorschrift.

Berekening:

mgr cholesterol in 100 cc serum = $(x - y) \times T_{\text{thio}} \times 14375$.

Berekening veresterd cholesterol:

Door de hoeveelheid totaal cholesterol te verminderen met

de vrije hoeveelheid, vindt men de hoeveelheid veresterd cholesterol.

Contrôle van de bepaling in serum:

In een aantal sera werden de cholesterolfracties volgens de beschreven methode bepaald, met en zonder toevoeging van een bekende hoeveelheid cholesterol aan het serumextract.

TABEL XVII

Mgr cholesterol per 100 cc serum:		58 mgr cholesterol toegevoegd aan 100 cc serum:	
Vrij:	Totaal:	Vrij:	Totaal:
57,4 mgr.	182,3 mgr	116,4 mgr	241,7 mgr
63,4 „	199,1 „	123,6 „	256,3 „
77,2 „	156,2 „	133,1 „	217,0 „
67,3 „	147,8 „	125,8 „	204,2 „

gemiddelde 58,2	{	59,0 mgr	59,4 mgr	{	gemiddelde 57,95
		60,2 „	57,2 „		
		55,9 „	60,8 „		
		58,5 „	54,4 „		

Uit deze contrôle van de voorgestelde methode blijkt duidelijk haar grote nauwkeurigheid; vergelijkende bepalingen met een andere methode werden door mij niet verricht, daar ik de gedane ijking meer dan voldoende achtte om de bruikbaarheid der methode te bewijzen.

LITERATUUR

- 1) F. RAPPAPORT en R. KLAPHOLZ. „Eine titrimetrische Cholesterinbestimmungsmethode in reinen Lösungen”. *Bioch. Zschr.* 258-467-1933.
- 2) FUJITA AKIJI en DANZO IWATAKE. „Bestimmung des echten Blutzuckers ohne Hefe”. *Bioch. Zschr.* 242-43-1932.
- 3) F. RAPPAPORT. „Mikrochemie des Blutes”.
F. RAPPAPORT en R. KLAPHOLZ. „Eine Mikromethode zur titrimetrischen Bestimmung des Gesamtcholesterins im Blute”. *Klin. Woch.* 13-333-1933.
F. RAPPAPORT en R. KLAPHOLZ. „Eine Mikromethode zur titrimetrischen Bestimmung des freien Cholesterins im Blute. *Klin. Woch.* 13-935-1934.
- 4) L. FLATOW. „Über ferricyanometrische Mikromethoden in der Blutanalyse”. *Bioch. Zschr.* 194-132-1928.

HOOFDSTUK III

OVER DE EXTRACTIE VAN VRIJ- EN VERESTERD CHOLESTEROL UIT BLOEDSERUM

Bij de quantitative bepaling van cholesterol in bloed (serum of plasma) is het natuurlijk van het grootste gewicht of de cholesterolfracties bij de gevolgde extractiemethode volledig uit deze vloeistof worden afgezonderd.

Wil men cholesterolbepalingen met elkander vergelijken op hun nauwkeurigheid, dan behoort op de allereerste plaats de methode van extraheren van deze stof uit de te onderzoeken vloeistof voor al deze methodes dezelfde te zijn; aan deze voorwaarde werd door mij in de bepalingen, die in hoofdstuk II beschreven zijn, voldaan. De gevolgde wijze van extractie moet niet alleen dezelfde zijn, maar men moet er zich daarenboven van overtuigd hebben, dat deze extractiemethode quantitatief is. De methode van BLOOR, (alhoewel enigszins gewijzigd) die ik in de bepalingen toepaste, levert betrouwbare resultaten.

Om de belangrijkheid van dit onderdeel der cholesterolbepaling heb ik gemeend enige aandacht aan deze bewerking te moeten wijden.

Volgende soorten van extractie der lipoïden uit serum vallen te onderscheiden:

- 1 - droge extractie,
- 2 - natte extractie.

§ 1 - *Extractie der lipoïden, na droging van het bloed (plasma of serum).*

In principe wordt hiertoe de te extraheren vloeistof gedroogd, fijngemalen en dan of kort *direct* met het extractiemiddel in aanraking gebracht en gefiltreerd of in een extractiehuls in een Soxhletapparaat met een of ander oplosmiddel uitgetrokken.

Een groot nadeel van deze methode is de langdurigheid ervan, speciaal van het drogen zelf; deze laatste bewerking mag niet bij te hoge temperatuur plaats hebben, daar anders ontleding optreedt en de bepaling foutief zou uitvallen.

Veel gebruikte extractievloeistoffen zijn:

alcohol,
aether,
petroleum-aether,
aceton,
chloroform,
benzol

e.a., die of alleen, of met elkander gemengd, of de een na de andere toegepast worden.

Om het drogen te versnellen gaf men in verschillende micro-methodes de vloeistof een groot oppervlak door ze te laten opzuigen in filtreerpapier; dit werd toegepast door BANG¹⁾, HARNES²⁾, LING³⁾, LEIBOFF⁴⁾, JUER⁵⁾ e.a.

Volgens KANNER⁶⁾ wordt met de methode van BANG wel het vrije cholesterol door petroleum-aether uit de droogrest opgelost, maar het veresterde cholesterol niet.

Door MIJERS en WARDELL⁷⁾ en DE TONI⁸⁾ wordt het bloed (serum) met gips gemengd, de massa gepoederd en deze met chloroform geëxtraheerd; de extractietijd is echter veel te kort. RICHTER en QUITTNER⁹⁾ gebruiken Na-fosfaat als droogmiddel, terwijl FRÄNKEL en ELFER¹⁰⁾ het serum met Na-sulfaat in de verhouding 100:66 samenwrijven; de ontstane vaste massa wordt na gepoederd te zijn meerdere dagen met petroleum-aether geëxtraheerd, welke tijd als voldoende voor quantitatief doel kan worden beschouwd!

Gips heeft als droogmiddel het voordeel, dat de totale massa in weinig tijds kurkdroog is; de extractie met vloeistoffen, die niet met water mengbaar zijn (chloroform), heeft dus direct effect, daar het oplosmiddel aanstonds „pakt”.

LEIBOFF¹¹⁾ verbeterde de methode van MIJERS en WARDELL⁷⁾ belangrijk.

HERMANN en NEUMANN¹²⁾ schudden het bloed met 95 %-ige alcohol en extraheren het neerslag dan langs omslachtige weg met petroleum-aether; de vloeistof wordt hierna afgedampt en de rest gedroogd, waardoor volgens THAYSEN verliezen kunnen optreden.

§ 2 - *Directe extractie der lipoïden uit het bloed (plasma of serum).*

Bij deze werkwijze wordt de waterige vloeistof direct in aanraking gebracht met het extractiemiddel, dat niet met water mengbaar mag zijn; door uitschudden van de vloeistof met b.v. chloroform kan dit worden bereikt. De vloeistoffen laat men dan weer ontmengen, waarna men het extractiemiddel met de opgeloste lipoïden verwijdt. Deze bewerking herhaalt men enige malen om quantitative extractie te verkrijgen.

Volgens deze methode, die naar mijn mening steeds onnauwkeurig is, kunnen verliezen moeilijk uitblijven; zij werd het eerst door ROESE en GOTTLIEB¹³⁾ voor de analyse van bloed en melk toegepast.

SAXON¹⁴⁾, HOLT, COURTNEY en FALES¹⁵⁾ en FOWWEATHER¹⁶⁾ pasten dit principe voor het onderzoek van faeces toe en brachten hierin grote verbeteringen aan.

WACKER en HUECK¹⁷⁾ tonen zich weinig ingenomen met de uitschudmethode; volgens hun onderzoekingen is een eenvoudig uitschudden van vloeistoffen als bloed of gal met aether, chloroform of andere extractie-vloeistoffen weinig quantitatief; het gedrag der lipoïden bij zulk een directe methode wijst erop, dat zij aan de overige colloïdale stoffen van het serum meer op physische wijze gebonden zijn, dan met z.g.n. „lockere chemische Bindungen”.

ADLER en LEMMEL¹⁸⁾ wijzen op de gelukkige omstandigheid, dat bij het neerslaan van fibrine uit bloed of plasma geen cholesterol, noch vrij, noch veresterd, in het neerslag wordt meegesleept.

Bij de directe, dus natte extractie van het serum volgens BLOOR¹⁹⁾, die door mij in de gegeven cholesterolbepalingen in gewijzigde vorm wordt toegepast, wordt door het neerslaan van de eiwitten in een bepaald mengsel van alcohol en aether inderdaad een quantitative lipoïdoplossing verkregen (hoofdstuk II).

BOYD²⁰⁾ wijzigde de oorspronkelijke methode van BLOOR door het alcohol-aether-mengsel niet te verwarmen, maar dit met het toegevoegde serum 24 uur bij gewone temperatuur te laten staan. De resultaten zouden dan beter zijn, alhoewel mij dit aan een onderzoek van serum, dat volgens de methodes van BLOOR en van BOYD geëxtraheerd was, in een serie van 5

gevallen niet gebleken is. De methode van BLOOR is door zijn snelheid en nauwkeurigheid te verkiezen en heeft daarom ruime toepassing gevonden. STEWART en WHITE²¹⁾ deden in dit verband aanvullende waarnemingen bij hun vetbepalingen in bloed.

Andere methodes, die op het principe van uitschudden in een scheitrechter berusten, werden toegepast door

GRIGAUT²²⁾ en AUTENRIETH-FUNK²³⁾.

GRIGAUT behandelde het serum eerst met alcoholische loog en schudde het mengsel daarna met aether uit. AUTENRIETH en FUNK koken het bloed of serum gedurende 2 uur met 25 %-ige kaliloog, deels om de esters te verzeppen, deels om een homogene vloeistof te verkrijgen; daarna extraheren zij de vloeistof met chloroform in een scheitrechter. Beide manieren leveren onbevredigende uitkomsten.

KLINKERT²⁴⁾ volgt de methode van GRIGAUT²²⁾, terwijl BÜRGER²⁵⁾ het serum met het tienvoudige volume sterke alcohol behandelt; om zeker te zijn, dat alle lipoiden gewonnen worden, wast hij het neerslag op het filter met chloroform en aether uit. Een overeenkomstige methode als BÜRGER volgt NEUSCHLOSZ²⁶⁾.

Volgens MÜHLBOCK en KAUFMANN²⁷⁾ is de extractiemethode, die BÜRGER en BEUMER²⁸⁾ bij verschillende onderzoeken volgden, onbetrouwbaar, wat voor de resultaten van hun onderzoek en het belang van hun conclusies van groot gewicht is. (Zie deel 2).

MÜHLBOCK en KAUFMANN, en GARDNER en GAINSBOROUGH²⁹⁾ controleerden de methode van BLOOR; de laatsten vonden, dat geen cholesterol in het eiwitneerslag achterblijft, indien men serum extraheert volgens BLOOR of met een 20-voudige hoeveelheid alcohol.

KUMAGAWA en SUTO³⁰⁾ delen een en ander mede over de oplosbaarheid van cholesterol in zeepoplossingen; zij vinden, dat het cholesterol uit zulke oplossingen buitengewoon moeilijk te extraheren is. Daar zich bij de verzeeping der cholesterolsters het vrijgekomen cholesterol eigenlijk ook in een zeepoplossing bevindt, is het duidelijk dat onnauwkeurige uitschudmethodes geen volledige extractie van deze stof uit het verzeppingsmilieu zullen tot stand brengen.

LITERATUUR

- 1) I. BANG. „Verfahren zur titrimetrischen Mikrobestimmung der Lipoidstoffe. *Münch. med. Woch.* 60-1243-1913.
- 2) A. HARNES. „The colorimetric determination of lipoidphosphorus in blood”. *J. biol. Chem.* 77-405-1928.
- 3) S. LING. „The determination of cholesterol in small amounts of blood”. *J. biol. Chem.* 76-361-1928.
- 4) S. LEIBOFF. „A simplified method for cholesterol determination in blood”. *J. biol. Chem.* 61-177-1924.
- 5) J. JUER. „Eine einfache Mikromethode zur Bestimmung des freien und veresterten Cholesterins im Blut”. *Bull. intern. Acad. pol. Sci. Cl. Med.* 10-377-1934.
- 6) O. KANNER. „Dosage direct de la cholestérine libre dans le sang par une méthode sans précipitation”. *C. r. Soc. biol. Paris* 108-383-1931.
- 7) V. MYERS en E. WARDELL. „The colorimetric estimation of cholesterol in blood, with a note on the estimation of coprosterol in feces” *J. biol. Chem.* 36-157-1918.
- 8) G. DE TONI. „The colorimetric estimation of cholesterol and lecithin in blood in connection with Folin and Wu's system of blood-analysis”. *J. biol. Chem.* 70-207-1926.
- 9) M. RICHTER-QUITTNER. „Über die Verteilung des Cholesterins und seiner Ester auf Blutkörperchen und Plasma unter physiologischen und pathologischen Verhältnissen”. *Wien. Arch. inn. Med.* 1-425-1920.
- 10) S. FRÄNKEL en A. ELFER. „Lipoidextraktion für Serum”. „Über ein Verfahren der Serumtrocknung”. *Bioch. Zschr.* 28-330-1910.
- 11) S. LEIBOFF. „An improved apparatus for determination of cholesterol”. *J. labor a. clin. Med.* 10-857-1925.
- 12) E. HERMANN en J. NEUMANN. „Über den Lipoidgehalt des Blutes normaler und schwangerer Frauen sowie neugeborener Kinder”. *Bioch. Zschr.* 43-47-1912.
- 13) ROESE en GOTTLIEB. *Zschr. Nahr. u. Gen. Mitt.* 9-531-1905.
M. KUMAGAWA en K. SUTO. „Ein neues Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Fettes und der unverseifbaren Substanzen im tierischen Material, nebst der Kritik einiger gebräuchlichen Methoden”. *Bioch. Zschr.* 8-212-1908.
- 14) G. SAXON. „A method for the determination of the total fat of undried feces and other moist masses”. *J. biol. Chem.* 17-99-1914.
- 15) L. HOLT, A. COURTNEY en H. FALES. „A method for the deter-

- mination of fat in dried feces and its distribution as soap, free fatty acids and neutral fat". *Am. J. Dis. Child.* 17-38-1919.
- 16) F. FOWWEATHER. „The determination of the amount and the composition of the fat of feces". „Investigation of a wet method and comparison with the dry method". *Brit. J. exp. Path.* 7-7-1926.
 - 17) L. WACKER en W. HUECK. „Chemische und morphologische Untersuchungen über die Bedeutung des Cholesterins im Blutserum". *Arch. exp. Path. u. Pharmak.* 74-416-1913.
 - 18) A. ADLER en H. LEMMEL. „Cholesterin und Cholesterinester im Blute Leberkranker". *Dtsch. Arch. klin. Med.* 158-173-1928.
 - 19) W. BLOOR. „A method for the determination of fat in small amounts of blood". *J. biol. Chem.* 17-377-1914.
W. BLOOR, K. PELKAN en D. ALLEN. „The seperate determination of cholesterol and cholesterolsters in small amounts of blood". *J. biol. Chem.* 52-191-1922.
W. BLOOR. „The determination of small amounts of lipids in blood plasma". *J. biol. Chem.* 77-53-1928, 82-273-1929.
 - 20) E. BOYD. „A differential lipid analysis of bloodplasma in normal young women by micro-oxydative methods". *J. biol. Chem.* 101-323-1933, 91-1-1931.
 - 21) C. STEWART en A. WHITE. „The estimation of fat in blood" *Bioch. Journ.* 19-840-1925.
 - 22) A. GRIGAUT. *C. r. Soc. biol. Paris* 68-791-1910, 71-441-1911.
 - 23) W. AUTENRIETH en A. FUNK. „Die Bestimmung des Gesamtcholesterins im Blut und in Organen". *Münch. med. Woch.* 60-1243-1913.
 - 24) KLINKERT. „Onderzoekingen en beschouwingen over de cholesterolinstofwisseling". *Ned. Tijdschr. v. Gen.* 2-2045-1912.
 - 25) M. BÜRGER en H. HABBS. „Die alimentäre Hypercholesterinaemie beim stoffwechselgesunden Menschen". *Zschr. ges. exp. Med.* 56-640-1927.
M. BÜRGER. *Erg. inn. Med. u. Kind. Heilk.* 34-583-1926.
 - 26) S. NEUSCHLOSZ. „Über den Lösungszustand des Cholesterins im Blutserum". *Bioch. Zschr.* 225-115-1930.
 - 27) O. MÜHLBOCK en C. KAUFMANN. „Die gravimetrische Cholesterinbestimmung im Blut und Serum". *Bioch. Zschr.* 233-222-1931.
 - 28) M. BÜRGER en H. BEUMER. *Klin. Woch.* 50-112-1913.
 - 29) J. GARDNER en H. GAINSBOROUGH. „Studies on the cholesterol content of normal human plasma". *Bioch. Journ.* 21-130-1927.
 - 30) M. KUMAGAWA en K. SUTO. „Ein neues Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Fettes und der unverseifbaren Substanzen im tierischen Material, nebst der Kritik einiger gebräuchlichen Methoden". *Bioch. Zschr.* 8-212-1908.

HOOFDSTUK IV

„OVER DE VERZEPING DER CHOLÉSTEROLESTERS IN BLOEDSERUM”

Naast de glycerine-esters der hogere vetzuren (de vetten) komen in het bloed esters van cholesterol voor met oliezuur, palmitinezuur en stearinezuur.

Een van de redenen waarom de resultaten van het cholesterolonderzoek in serum zover uiteenlopen, moet, behalve in het verschil van extractiemethoden, die bij het bloedonderzoek toepassing vinden, gezocht worden in de wijze, waarop de genoemde esters worden verzeepd.

Bij de eenvoudige colorimetrische bepaling van de totale hoeveelheid cholesterol was een eigenlijke verzeeping niet noodzakelijk; vrij- zowel als veresterd cholesterol geven de reactie van LIEBERMANN en BURCHARD. Daar echter de kleurnuance in beide gevallen verschilt, leverde deze methode geen bevredigende resultaten op.

Door de digitoninemethode werd men in staat gesteld het vrije cholesterol van zijn esters te scheiden en ik heb bij de bespreking van de colorimetrie (hoofdstuk II) gelegenheid gehad er op te wijzen, dat van de digitoninemethode gebruik gemaakt werd om direct of indirect colorimetrisch beide fracties te bepalen.

Wil men echter het vrije cholesterol en het veresterde deel volgens de digitoninemethode bepalen, dan moet voor dit doel een volledige verzeeping der esters worden bereikt; dat dit niet zo eenvoudig is kan blijken uit de bespreking, die ik aan deze verzeeping hieronder heb gewijd.

Van de gebruikelijke verzepingsmiddelen, die men hiervoor gebruikte, zijn te noemen:

- 1 - *Waterige* kali- of natronloog in verschillende sterkte.
- 2 - *Alcoholische* loog in verschillende samenstelling.
- 3 - *Na-aethylaat* oplossingen (soms ook van kalium).

§ 1 - Verzeping van de esters met loog.

Het is begrijpelijk, dat alcoholhoudende vloeistoffen voor de genoemde verbindingen een beter verzepingsmilieu zullen zijn dan waterige, daar vetten, en esters van cholesterol in het bijzonder, onoplosbaar zijn in water, maar oplosbaar in alcohol.

„In het algemeen geldt voor de vetten, dat deze door koken met water nauwelijks worden aangegrepen, dat echter door verhitten met alkaliën, bijzonder in alcoholische oplossing, snelle verzeping plaats heeft.” (HOPPE-SEYLER-THIERFELDER).

„De verzeping der esters van cholesterol met waterige alkali-oplossingen is niet zo volledig, als wanneer van alcoholische of van alcoholaat-(Na) oplossingen gebruik gemaakt wordt.” (KOSSEL en OBERMÜLLER¹⁾).

DELPRAT²⁾, AUTENRIETH-FUNK³⁾, TOMINAGA⁴⁾, NEKLUDOW en CHALATOW⁵⁾, HANDOVSKY⁶⁾ en HINRICHS en KLEMM⁷⁾ brengen het te onderzoeken bloed of serum direct in aanraking met de verzepingsvloeistof; deze is afwisselend waterig of alcoholisch. Ook RAPPAPORT²⁶⁾ past deze methode toe.

DELPRAT en TOMINAGA verzeppen gedurende enige tijd met 8 % alcoholische loog op een kokend waterbad; de eerste laat de verzeping 1½ uur duren, terwijl AUTENRIETH en FUNK gedurende 2 uur met 25 %-ige natronloog op een waterbad verwarmen.

Volgens NEKLUDOW worden de hoogste waarden aan cholesterol gevonden, indien het serum met de 10-voudige overmaat aan ± 30 %-ige natronloog behandeld wordt; een grotere overmaat is welhaast ondenkbaar.

RAPPAPORT en ENGELBERG⁸⁾, OKEY⁹⁾, COQUELET¹⁰⁾, RICHTER-QUITTNER¹¹⁾ passen allen verzeping met natronloog toe; zij vinden hun uitkomsten voldoende betrouwbaar, alhoewel bijna geen van hen contrôlebepalingen verrichtte om de betrouwbaarheid der gevolgde methode te toetsen.

KATSURA en zijn medewerkers¹²⁾ verkiezen natronloog boven Na-aethylaat, daar deze laatste stof organische substantie aan het extract zou afgeven (hoofdstuk IIc)

YOSHIMATSU¹³⁾, STODDARD en DRURY¹⁴⁾, MANCKE¹⁵⁾ extraheren het serum eerst met het bekende alcoholaethermengsel

(BLOOR) en passen daarna een verschillende verzeping toe. De eerste dampst, na eerst de aether verdreven te hebben, het extract met 5 normaal natronloog in, terwijl STODDARD en DRURY met sterke natronloog 30 min. op een waterbad verhitten; MANCKE verwarmt de esteroplossing gedurende 6 uur op een waterbad met enkele druppels 80 %-ige kaliloog.

KRÖNER ¹⁶⁾ controleerde de verzepingsmethode van MANCKE en vond, dat een driemaal langere tijd geen invloed heeft op de gevonden hoeveelheid totaal cholesterol.

Gevonden vlg. MANCKE:	Gevonden vlg. KRÖNER:
131 mgr cholesterol	128 mgr cholesterol
134 „ „	135 „ „

Uit deze proeven blijkt wel, dat kortere of langere verzepingstijd weinig invloed heeft, maar niet of alle aanwezige esters werkelijk gesplitst worden.

RAPPAPORT is een der weinige onderzoekers, die bewijst dat de gevolgde methode van verzeping werkelijk quantitative resultaten geeft; vele mededelingen stellen alleen een bepaalde verzepingsmethode voor, zonder dat men er zich degelijk van overtuigde, dat de methode effectief was.

In een enkel geval werd barytwater bij de verzeping der cholesterolsters toegepast; BLOCH ¹⁷⁾ maakte hiervan gebruik. Of deze methode bruikbaar is, werd niet door mij nagegaan.

§ 2 - *Verzeping van de esters met alcoholaatoplossingen.*

Over de toepassing van Na-aethylaatoplossingen bij de verzeping van de cholesterolsters in serum is in de literatuur vrij veel bekend; omtrent de bestendigheid van cholesterol t.o.v. deze stof lopen de meningen ver uiteen.

OBERMÜLLER ¹⁸⁾ maakte hiervan voor het eerst gebruik; GARDNER ¹⁹⁾ laat serum of serumextract gedurende 36 uur met 10 %-ig Na-aethylaat staan en constateert, dat de verzeping der esters bij gewone temperatuur volledig verloopt.

MÜHLBOCK en KAUFMANN ²⁰⁾ behandelen de esterhoudende vloeistof met 8 %-ig Na-aethylaat; zij verwarmen het mengsel 4 uur op een electrisch zandbad zodanig, dat de vloeistof zacht kookt.

OSATO en HEKI²¹⁾, OBERMER²²⁾, MONASTERIO²³⁾ en FRÖLICHER²⁴⁾ passen bij het cholesterolonderzoek allen een verzeeping met alcoholaatoplossingen van verschillende concentratie toe.

Terwijl OBERMER en MILTON²²⁾ sterke oplossingen gebruiken (tot 20 %), meent MONASTERIO²³⁾, dat lage concentraties reeds quantitatief resultaat opleveren.

FRÖLICHER²⁴⁾ deed contrôlebepalingen; hij ging na of het verschil maakte of hij de esters 5 uur op een kokend waterbad met 5 % Na-aethylaat behandelde, of dat hij de esterhoudende vloeistof hiermede 24 uur bij gewone temperatuur liet staan; hij vond in beide gevallen dezelfde uitkomsten.

THAYSEN²⁵⁾ verzeepde met aethylaatoplossingen, die verkregen waren door 1,3 gr. Natrium in 25 cc absolute alcohol op te lossen; hij vond, dat bij een esterconcentratie van 1,8⁰/₀₀ na 4 uur en bij een van 0,9⁰/₀₀ na 2 uur totale verzeeping had plaats gevonden.

RAPPAPORT en KLAPHOLZ²⁶⁾ mengen het serum direct met een alcoholaatoplossing en voeren dan de hydrolyse uit bij 130° onder druk gedurende 55 minuten.

Zij bewijzen, zoals uit een bijgevoegde tabel blijkt, dat op deze wijze inderdaad de verzeeping der cholesterolsters volledig verloopt.

Vele andere onderzoekingen over de splitsing der esters van cholesterol zijn gepubliceerd; bij de bespreking heb ik mij echter tot de voornaamste beperkt.

Alvorens nu de resultaten van een eigen onderzoek over deze verzeeping mede te delen, zou ik enige ogenblikken willen stilstaan bij de vraag, hoe groot de bestendigheid van cholesterol is ten opzichte van de bovengenoemde verzeepingsvloeistoffen.

§ 3 - *Bestendigheid van cholesterol bij de verzeeping van zijn esters.*

GRUNKE²⁷⁾ nam waar, dat cholesterol geen verandering ondergaat bij koken met kaliloog; volgens hem is het een zeer bestendige verbinding.

LEPIN²⁸⁾ meent, dat cholesterol in alkalische oplossing wordt omgezet in meta-cholesterol.

Naar de mening van DARMSTAEDTER²⁹⁾ en LIFSCHÜTZ³⁰⁾ is cholesterol in oplossingen van Na-aethylaat niet bestendig; ofschoon de opmerkingen van laatstgenoemde onderzoekers weerlegd schijnen te worden door THAYSEN en FEX³¹⁾, deelt DAM³²⁾ enige waardevolle waarnemingen mede, die, gezien de betrouwbaarheid waarmede DAM zijn onderzoekingen verrichtte, grote aandacht verdienen; zij verschillen in conclusie totaal met de resultaten, die THAYSEN en FEX uit hun proeven verkregen.

DAM toonde aan, dat de verliezen aan cholesterol bij verzeeping van serum met aethylaat bij gewone temperatuur kleiner zijn ($\pm 1,3\%$), dan wanneer de verzeeping bij hogere temperatuur wordt uitgevoerd; in het laatste geval bleken zij ongeveer 7% te bedragen.

DAM verzeepde bij kamertemperatuur 72 uur, terwijl GARDNER en FOX³³⁾ het Na-aethylaat onder dezelfde omstandigheden 24 uur lieten inwerken.

Men kan aannemen, dat wanneer DAM zijn koude verzeeping eveneens 24 uur zou hebben laten duren, bij zijn proeven de verliezen kleiner zouden zijn geweest dan 1,3%. EWERT³⁴⁾ komt tot hetzelfde resultaat als DAM.

Op het resultaat van de verzeeping der esters op de wijze, zoals DAM, EWERT e.a. deze deden plaats hebben, kan ook nog een andere factor van grote invloed zijn; het kan n.l. verschil maken of de zuurstof van de lucht gemakkelijk kan toetreden of zoveel mogelijk geweerd wordt.

DAM nam hiertegen geen maatregelen, andere onderzoekers evenmin.

Dat de inwerking van de luchtzuurstof van invloed kan zijn op de verzeeping van de cholesterolsters werd aangetoond door BLIX en LÖWENHIELM³⁵⁾; persoonlijk hecht ik aan dit onderzoek grote waarde, terwijl ik hun gevolgtrekkingen volkomen aanvaard.

Zij luiden:

1 - De vorming van oxy-cholesterol bij verhitting van cholesterol aan de lucht bij temperaturen boven het smeltpunt of bij het blootstellen van cholesterol suspensies aan de lucht is te wijten aan de inwerking van de luchtzuurstof.

2 - Dat suspensies van zeer zuiver cholesterol, zelfs bij kookhitte, zeer bestendig zijn tegen gewone zuurstof wordt door hen bevestigd, in overeenstemming met een onderzoek van ROBERTSON.³⁶⁾

3 - Onzuiverheden in het cholesterol aanwezig oefenen een katalytische invloed uit op de vorming van oxy-cholesterol, wanneer lucht kan toetreden.

4 - Alkali-zeepoplossingen oefenen een opmerkelijk versnellende invloed uit op de oxydatie van cholesterol door moleculaire zuurstof (lucht).

Ongeveer tot dezelfde uitkomsten komt OKEY³⁷⁾, die zegt, dat door de gewone verzepingsmethodes het cholesterol zo veranderd wordt, dat het door digitonine niet meer quantitief kan worden neergeslagen.

Na de gebruikelijke verzeeping der cholesterolsters met sterke natronloog in alcoholische oplossing en hierna volgend afdampen van de alcohol, bleek 10-30 % van het cholesterol niet meer als digitonide neer te slaan.

Indien de alcohol daarentegen na de verzeeping door een warme stroom stikstof werd verdreven, dan was ruim 94 % van het cholesterol als choldig aan te tonen; het verlies van deze stof in het eerste geval moet dus klaarblijkelijk aan oxydatie worden toegeschreven.

Wanneer bij de verzeeping zelf nu ook nog maatregelen worden getroffen om het toetreden van de lucht zoveel mogelijk te verhinderen, dan moet van de hoeveelheid aanwezig cholesterol nog meer worden teruggevonden.

Deze veronderstelling vindt in de volgende door mij verrichte proeven zijn bevestiging.

50 mgr cholesterol werden nauwkeurig tot 100 cc in sterke alcohol opgelost en hierin langs twee wegen het cholesterol bepaald; in het ene geval kreeg bij het koken van de cholesteroloplossing met 5 % Na-aethylaat de lucht gelegenheid in te werken, in het andere geval had de aethylaatbehandeling plaats onder bijna volkomen luchtafsluiting; dit laatste werd bereikt door van een lange (± 60 cM) opzetbuis gebruik te maken.

De bepaling van het cholesterol in beide gevallen geschiedde langs oxydimetrische weg.

TABEL XVIII

Kooktijd: Na-aethylaat: in open buis: met stijgbuis:		Cholesterol, bepaald		Cholesterol
5 %				ingewogen:
1 uur	2 cc	45,6 mgr	49,3 mgr	50 mgr
2 „	2 „	45,5 „	50,1 „	50 „
4 „	2 „	45,6 „	49,2 „	50 „
5 „	2 „	45,0 „	49,1 „	50 „
6 „	2 „	40,7 „	48,9 „	50 „

De inwerking van de luchtzuurstof is dus wel degelijk van invloed op de verkregen uitkomsten bij de bepaling van cholesterol, indien verzeep wordt met aethylaatoplossingen.

Bij de splitsing der cholesterolsters in de bepalingen, die door mij in hoofdstuk II beschreven zijn, is met deze omstandigheid rekening gehouden; de verzeeping der esters wordt daar uitgevoerd met Na-aethylaat in kolfjes van 50 cc, die voorzien zijn van een aangeslepen luchtkoeler van ongeveer 50 cM lengte. Wanneer de alcoholische vloeistof hierin zacht kookt, behoeft men niet te vrezen dat de zuurstof van de lucht schadelijk kan inwerken, terwijl het verdampen van alcohol meer dan voldoende wordt tegengegaan.

§ 4 - *Over de verzeepingstijd der cholesterolsters.*

Voor een bepaling van de totale hoeveelheid cholesterol in serum is het noodzakelijk te weten welke tijd voldoende is om een volkomen verzeeping der esters te bewerkstelligen; voor dit doel bereidde ik eerst de zuivere esters en ging aan deze na, hoelang de inwerking van verschillende verzeepingsmiddelen moest duren tot de gehele esterhoeveelheid gesplitst was.

Bereiding der zuivere esters.

1 - Cholesterol-acetaat.

Verhit een mengsel van 10 gr cholesterol (MERCK) met 10 cc azijnzuur-anhydriet (K.p.a.) in een rondbodem van 100 cc (met luchtkoeler) gedurende 4 uur op een electrisch zandbad; de temperatuur moet zo hoog zijn, dat de massa zacht kookt, echter niet hoger, daar anders ontleding en sterke bruinkleuring optreedt. De inhoud van de kolf giet men nu in een mortier en wast de vaste massa vele malen met aqua dest.;

door kneden en wrijven worden de laatste resten anhydriet en azijnzuur verwijderd.

De bijna witte vaste stof, die waarschijnlijk min of meer verontreinigd zal zijn met cholesterol, kristalliseert men nu 6 maal uit sterke alcohol om; bij de eerste omkristallisatie behandelt men de oplossing met beenderkool om ze te ontkleuren. Tenslotte worden de verkregen kristallen onder luchtafsluiting (in een koolzuurstroom) tot constant gewicht gedroogd bij 102°. Smeltpunt 114°.

In dit preparaat is met digitonine geen vrij cholesterol meer aan te tonen.

2 - Cholesterol-palmitaat.

6 gr cholesterol (MERCK) en 10 gr palmitinezuur (MERCK) verhit men in een rondbodem als boven te zamen gedurende 4 uur op een electrisch zandbad bij $\pm 200^\circ$.

De enigszins afgekoelde, bruingekleurde massa giet men in een pyrex-bekerglas, waarin zij vast wordt. Na volkomen afkoelen lost men ze in zo weinig mogelijk aether op.

Aan deze oplossing voegt men watervrije, te voren in ijs afgekoelde aceton toe, waardoor het palmitaat neerslaat.

De kristallen worden op een gewoon filter gebracht en met koude aceton gewassen; het aldus verkregen palmitaat kristalliseert men driemaal uit watervrije aceton bij kookhitte om, waarna het smeltpunt constant blijft (79°).

Met digitonine is hierin geen vrij cholesterol meer aan te tonen.

3 - Cholesterol-oleaat.

6 gr cholesterol (MERCK) en 10 gr oliezuur (MERCK) verhit men in een rondbodem (zie 1) gedurende 6 uur op een electrisch zandbad bij 200°.

De vloeistof kleurt zich hierbij sterk bruin; na volledig afkoelen giet men de vloeistof in alcohol van 96 % uit, die tevoren sterk in ijs is afgekoeld. De in het begin nog vloeibare massa wordt langzaam korrelig vast. De vaste stof zuigt men snel af en wast met koude alcohol na; hierna lost men deze in zo weinig mogelijk aether op en giet deze oplossing in ijskoude aceton uit. Het cholesterol-oleaat scheidt zich nu

in fijne kristalblaadjes af, die snel afgezogen worden. Dit oplossen in aether en neerslaan met aceton wordt nog viermaal herhaald en de verkregen vettige, licht smeltbare kristallen plaats men in een exsiccator op een koele plaats, in het donker boven zwavelzuur.

Bij contrôle blijkt in de stof geen vrij cholesterol meer aanwezig te zijn.

Om de ester te bewaren wordt zij in bruine buizen ingesmolten.

Verzepingsreeksen: (Alleen de uitkomsten, niet de gevolgde methode, deel ik hier mede).

a - Voor Cholesterol-acetaat.

TABEL XIX

Verzepingstijd:	Ester als cholesterol berekend:	Ester verzeept met	
		Aethylaat 5 %:	KOH 80 %:
1 uur	30 mgr	29,7 mgr	28,1 mgr
1 „	30 „	30,2 „	27,3 „
2 „	30 „	29,3 „	27,8 „
2 „	30 „	29,4 „	27,1 „
3 „	30 „	29,7 „	28,2 „
4 „	30 „	28,0 „	28,9 „
6 „	30 „	29,3 „	28,4 „

als cholesterol berekend.

Opmerkingen:

- 1 - De verzeping werd uitgevoerd in open buizen, in alcoholische oplossing, bij kooktemperatuur. De invloed van de luchtzuurstof bleek niet aan te tonen, ook niet in de volgende reeksen; de buishoogte zal voldoende geweest zijn om ongunstige inwerking te verhinderen.
- 2 - Alhoewel kaliloog, evenals Na-aethylaat, de verzeping van de esters sterk bevordert, wordt de volledige splitting van deze stoffen echter alleen door aethylaat in betrekkelijk korte tijd bereikt.
- 3 - Een oorzaak voor de snelle verzeping van deze ester moet gezocht worden in het feit, dat cholesterolacetaat

goed oplosbaar is in alcohol; de reactie heeft dus in ware oplossing plaats.

b - Voor cholesterol-palmitaat.

TABEL XX

Verzepingstijd:	Ester als cholesterol berekend:	Ester verzeept met	
		aethylaat 5 %:	KOH 80 %:
1 uur	30 mgr	18,9 mgr	26,4 mgr
1 „	30 „	19,2 „	26,5 „
2 „	30 „	21,7 „	26,7 „
2 „	30 „	21,6 „	26,9 „
3 „	30 „	30,4 „	28,0 „
4 „	30 „	— „	29,4 „
6 „	30 „	30,2 „	29,8 „

als cholesterol berekend.

Opmerkingen:

Bij verzeping met aethylaat worden eerst na 3 uur quantitative uitkomsten verkregen; klaarblijkelijk wordt het palmitaat door kaliloog sneller verzeept dan door Na-aethylaat, alhoewel volledige hydrolyse eerst na langere tijd wordt verwezenlijkt.

c - Voor cholesterol-oleaat.

TABEL XXI

Verzepingstijd:	Ester als cholesterol berekend:	Ester verzeept met	
		aethylaat 5 %:	KOH 80 %:
1 uur	30 mgr	18,7 mgr	27,2 mgr
1 „	30 „	19,2 „	27,1 „
2 „	30 „	25,7 „	28,4 „
2 „	30 „	26,5 „	28,4 „
3 „	30 „	29,7 „	29,7 „
4 „	30 „	30,0 „	28,6 „
6 „	30 „	29,4 „	28,9 „

als cholesterol berekend.

Opmerkingen:

Deze tabel geeft ongeveer hetzelfde beeld als de vorige; het oleaat wordt echter met kaliloog nog iets sneller gesplitst dan het palmitaat.

De cijfers in de drie laatste tabellen zijn alle gemiddelden van uitkomsten, die het resultaat waren van duplobepalingen; de waarden van deze duplobepalingen stemden goed met elkander overeen.

Conclusie.

- 1 - Het blijkt, dat Na-aethylaat cholesterolesters, alhoewel niet sneller, toch in dezelfde tijd, vollediger verzeept dan kaliloog.
- 2 - De verzeeping van het acetaat verloopt vlugger met beide verzeepingsmiddelen dan die van de beide andere esters. Het acetaat is beter oplosbaar in alcohol dan het palmitaat en het oleaat; waarschijnlijk is dit de reden der vluggere verzeeping.
- 3 - De beide laatste esters moeten een $\pm$ 3-urige behandeling met Na-aethylaat ondergaan, willen zij volledig gehydrolyseerd worden, alhoewel steeds van het aethylaat werd aangenomen, dat het uiterst snel de verzeeping voltooide.

Daar door mij in de bepalingsmethodes voor cholesterol (hoofdstuk II) van Na-aethylaat gebruik gemaakt wordt om het totaal cholesterol te bepalen, heb ik, omdat het bovenstaande resultaat mij bevreemdde, contrôles op de door mij gevolgde verzeepingswijze verricht, en wel op de navolgende manier.

10 cc serum wordt volgens BLOOR op de gewone wijze ont-eiwit (mengsel tot 100 cc) en in de helft van het verkregen serumextract een bekende hoeveelheid cholesterolester opgelost.

In het normale serumextract wordt nu, na verzeeping der esters met Na-aethylaat, op de gewone wijze het totaal cholesterol bepaald, zowel als in het serumextract, waarin de bekende hoeveelheid extra-ester was opgelost.

De toegevoegde esterhoeveelheid wordt tevoren omgerekend op vrij cholesterol, terwijl de eigenlijke cholesterolbepaling volgens de oxydimetrische methode wordt uitgevoerd.

TABEL XXII

Verzepings- tijd met 5% aethylaat:	Totaal cholesterol per 100 cc serum:	Cholesterol toegevoegd:	Totaal cholesterol per 100 cc serum:	Vershil als cholesterol berekend:
<i>als acetaat:</i>				
1 uur	174,6 mgr	30 mgr	203,4 mgr	28,8 mgr
2 „	172,4 „	30 „	202,6 „	30,2 „
3 „	173,7 „	30 „	202,0 „	28,3 „
<i>als palmitaat:</i>				
1 uur	184,4 mgr	30 mgr	213,0 mgr	28,6 mgr
2 „	182,4 „	30 „	209,6 „	27,2 „
3 „	183,5 „	30 „	212,8 „	29,3 „
<i>als oleaat:</i>				
1 uur	134,6 mgr	30 mgr	162,2 mgr	27,6 mgr
2 „	132,4 „	30 „	160,5 „	28,1 „
3 „	133,7 „	30 „	162,9 „	29,2 „

Resultaat:

De verzepingstijden 1, 2 of 3 uur blijken op de uitkomsten der bepaling van geen grote invloed te zijn; hieruit heb ik geconcludeerd, dat 1 uur verzeppen bij kookhitte als ruim voldoende te beschouwen is.

Ten overvloede werden dezelfde contrôleverzepingen ook verricht met 80 %-ige kaliloog, de methode zoals MANCKE die bij zijn bepalingen toepast.

TABEL XXIIA

Verzepings- tijd met 80% KOH:	Totaal cholesterol per 100 cc serum:	Cholesterol toegevoegd:	Totaal cholesterol per 100 cc serum:	Vershil als cholesterol berekend:
<i>als acetaat:</i>				
1 uur	118,4 mgr	30 mgr	144,8 mgr	26,4 mgr
2 „	119,6 „	30 „	146,7 „	27,1 „
3 „	119,4 „	30 „	146,2 „	26,8 „
<i>als palmitaat:</i>				
1 uur	145,2 mgr	30 mgr	170,8 mgr	25,6 mgr
2 „	144,8 „	30 „	170,9 „	26,1 „
3 „	146,2 „	30 „	173,4 „	27,2 „
<i>als oleaat:</i>				
1 uur	126,7 mgr	30 mgr	155,7 mgr	29,0 mgr
2 „	125,8 „	30 „	152,1 „	26,3 „
3 „	125,6 „	30 „	153,0 „	27,4 „

Resultaat:

De verschillende verzepingstijden blijken weinig invloed uit te oefenen op de gevonden hoeveelheden totaalcholesterol; de volledige verzeping van de cholesterolesters was na een 3-urige behandeling met sterke kaliloog echter nog niet verwezenlijkt.

Het komt mij dus voor, dat het rationeler is van Na-aethylaat als verzepend agens gebruik te maken dan van 80 %-ige kaliloog.

Vergelijkende onderzoeken over de verzeping der cholesterolesters werden ook verricht door PAGE en RUDY.³⁸⁾

ITTER³⁹⁾ gaf een overzicht van de methodes, die bij de verzeping toepassing vonden.

Het is interessant de uitkomsten van GARDNER en FOX³³⁾ weer te geven, die op verschillende manieren de cholesterolesters verzeepden en duidelijk aantoonde, dat niet elke methode tot quantitative resultaten leidt. De inwerking van de zuurstof van de lucht werd bij hun onderzoek jammer genoeg buiten beschouwing gelaten.

Onder de volgende omstandigheden lieten zij de verzeping plaats vinden:

- 1 - De esters lieten zij over nacht met 2 % natronloog staan.
- 2 - De esters werden 4 uur verhit met 25 %-ige NaOH-oplossing op vrij hoge temperatuur.
- 3 - De esters werden 4 uur gekookt met natronloog, die normaal was.
- 4 - De in aether opgeloste esters werden gemengd met een verzadigde Na-aethylaatoplossing en gedurende 24 uur bij gewone temperatuur aan zich zelf overgelaten.

Verzepingsresultaat in geval:

<i>Esters,</i>	(1)	(2)	(3)	(4)
oleaat,	0 %	100 %	100 %	100 %
palmitaat,	0 %	30 %	100 %	100 %
stearaat,	0 %	96 %	100 %	98 %

MICHALSKI⁴⁰⁾ constateerde, dat de cholesterolesters van het bloed, door deze vloeistof in een thermostaat te plaatsen, ge-

splitst werden; deze verzeeping meende hij niet anders te kunnen verklaren dan door de aanwezigheid van een cholesterol-ester-splitsend enzym in het bloed aan te nemen, welk enzym de naam van cholesterase zou moeten dragen.

Dat het inderdaad verschil maakt in de uitkomst van de bepaling van vrij cholesterol of het serum aanstonds wordt onderzocht of eerst enige dagen later, nadat het bij kamertemperatuur afgesloten gestaan heeft, blijkt uit de volgende analyses.

Vrij cholesteroi per 100 cc serum:	
<i>vers serum:</i>	<i>± 3 dagen oud:</i>
80,4 mgr	86,2 mgr
87,3 „	89,1 „
62,7 „	69,7 „
71,5 „	72,9 „
42,3 „	47,2 „

LITERATUUR

- ¹⁾ KOSSEL en OBERMÜLLER. *Zschr. physiol. Chem.* 14-559-1890.
- ²⁾ E. DELPRAT. Dissertatie. Amsterdam 1921.
- ³⁾ W. AUTENRIETH en A. FUNK. „Die Bestimmung des Gesamtcholesterins im Blut und in Organen”. *Münch. med. Woch.* 60-1243-1913.
- ⁴⁾ F. TOMINAGA. *Bioch. Zschr.* 136-109-1923.
- ⁵⁾ W. NEKLUDOW en S. CHALATOW. „Vergleichende Studien über die Verwertung der quantitativen Cholesterinbestimmungsmethoden im Blutserum nach Gewichts- und Colorimetrieprinzip”. *Bioch. Zschr.* 208-60-1929.
- ⁶⁾ K. HANDOVSKY, K. LOHMANN en P. BOSSE. „Untersuchungen über den Zustand des Cholesterins im Blutserum”. *Pfl. Arch. ges. Physiol.* 210-63-1925.
- ⁷⁾ A. HINRICHS en L. KLEMM. „Erfahrungen über die titrimetrische Mikrocholesterinbestimmung”. *Bioch. Zschr.* 210-191-1929.
- ⁸⁾ F. RAPPAPORT en H. ENGELBERG. „Eine Mikromethode der Cholesterinbestimmung”. *Klin. Woch.* 1-700-1931.
- ⁹⁾ R. OKEY. „A micromethod for the estimation of cholesterol by oxidation of the digitonid”. *J. biol. Chem.* 88-367-1930.
- ¹⁰⁾ O. COQUELET. „Microdosage colorimétrique du cholestérol”. *C. r. Soc. biol. Paris* 97-749-1927.
- ¹¹⁾ M. RICHTER-QUITTNER. „Über die Verteilung des Cholesterins und seiner Ester auf Blutkörperchen und Plasma unter physiologischen und pathologischen Verhältnissen”. *Wien. Arch. inn. Med.* 1-425-1925.
- ¹²⁾ SH. KATSURA, T. HATAKEYAMA en K. TAJIMA. „Eine titrimetrische Bestimmungsmethode für kleine Mengen Phosphatiden, freies und Estercholesterin, etc. *Bioch. Zschr.* 269-231-1934.
- ¹³⁾ S. YOSHIMATSU. „A new colorimetric method for free, ester and total cholesterol determination with 0,1 cc of blood”. *Tohoku J. exp. Med.* 17-1931.
- ¹⁴⁾ J. STODDARD en P. DRURY. „A titrationmethod for blood fat”. *J. biol. Chem.* 84-741-1929.
- ¹⁵⁾ R. MANCKE. „Studien über den Cholesterinstoffwechsel”. *Bioch. Zschr.* 231-103-1931.
- ¹⁶⁾ W. KRÖNER. „Einige Bemerkungen zur nephelometrischen Cholesterinbestimmung nach Mühlbock, Kaufmann und Wolff”. *Bioch. Zschr.* 260-403-1933.
- ¹⁷⁾ A. BLOCH. „Eine neue Methode der Cholesterinbestimmung” *Schweiz. med. Woch.* 1-108-1931.

- 18) K. OBERMÜLLER. „Weitere Beiträge zur quantitativen Bestimmung des Cholesterins". *Zschr. physiol. Chem.* 16-143-1892.
- 19) J. GARDNER en F. FOX. „A critical study of the methods of estimating cholesterol and its esters in tissues". *Bioch. Journ.* 18-1058-1924.
- 20) O. MÜHLBOCK en C. KAUFMANN. „Eine gravimetrische Cholesterinbestimmungsmethode für klinische Untersuchungszwecke". *Klin. Woch.* 2-2019-1930.
- 21) S. OSATO en M. HEKI. „On a microdetermination of lipids in tissues". *J. biol. Chem.* 87-541-1930.
- 22) E. OBERMEYER en R. MILTON. „A microphotometric method for the determination of free cholesterol and cholesterol esters in blood plasma". *Bioch. Journ.* 24-345-1933.
- 23) G. MONASTERIO. „Die titrimetrische Mikrobestimmung des Cholesterins". *Bioch. Zschr.* 265-444-1933.
- 24) E. FRÖLICHER en E. H. SÜLLMANN. „Die Veresterung von Cholesterin bei der Resorption aus dem Darm". *Bioch. Zschr.* 274-21-1934.
- 25) TH. THAYSEN. *Bioch. Zschr.* 62-89-1914.
- 26) F. RAPPAPORT en R. KLAPHOLZ. „Eine Mikromethode zur titrimetrischen Bestimmung des Gesamtcholesterins im Blute". *Klin. Woch.* 13-333-1933.
- 27) W. GRUNKE. „Über die Ausscheidung des Cholesterins im Harn". *Bioch. Zschr.* 132-549-1922.
- 28) L. LEPIN. „Studien über die Adsorption des Cholesterins". *Bioch. Zschr.* 226-195-1930.
- 29) DARMSTAEDTER en J. LIFSCHÜTZ. „Beiträge zur Kenntnis der Zusammensetzung des Wollfetts". *Zschr. physiol. Chem.* 31-1122-1898.
- 30) J. LIFSCHÜTZ. „Über die Oxydation des Cholesterins". *Zschr. physiol. Chem.* 50-436-1907.
- 31) J. FEX. „Chemische und morphologische Studien über das Cholesterin und die Cholesterinester in normalen und pathologisch veränderten Organen". *Bioch. Zschr.* 104-82-1930.
- 32) H. DAM. „Einige Bemerkungen in bezug auf die Bestimmung von Cholesterin". *Bioch. Zschr.* 194-177-1928.
H. DAM. „Die Bestimmung von Cholesterin nach der Digitoninmethode besonders in Hühnereiern und Hühnchen". *Bioch. Zschr.* 215-468-1929.
- 33) J. GARDNER en F. FOX. „A critical study of the methods of estimating cholesterol and its esters in tissues". *Bioch. Journ.* 18-1058-1924.
- 34) B. EWERT. „Über die gravimetrische Cholesterinbestimmung und eine Methode zur Cholesterin Analyse von Organgeweben". *Bioch. Zschr.* 263-149-1933.
- 35) G. BLIX en G. LÖWENHIJLM. „On the oxidation of cholesterol by molecular oxygen". *Bioch. Journ.* 22-1313-1928.
- 36) ROBERTSON. *Austr. J. exp. biol. med. Sci.* 2-83-1925.
- 37) R. OKEY. „A micromethod for the estimation of cholesterol by oxidation of the digitonid". *J. biol. Chem.* 88-367-1930.
- 38) J. PAGE en H. RUDY. *Bioch. Zschr.* 220-304-1904.

- ³⁹⁾ E. RITTER. „Über die Methoden, die zur Abscheidung der Cholesterinester aus den Fetten und zu ihrer quantitativen Bestimmung verwertbar sind“. *Zschr. physiol. Chem.* 34-430-1899.
- ⁴⁰⁾ Z. MICHALSKI. *Polska gaz. lekarska.*
- ⁴¹⁾ J. SCHULTZ. „Cholesterinase in Blut“. *Bioch. Zschr.* 52-255-1912.

HOOFDSTUK V

„OVER DIGITONINE”

§ 1 - *Over de formule en de zuiverheid van het digitonine.*

Digitonine behoort tot een groep van in de natuur voorkomende stoffen^{o)}, die men neutrale *saponinen* noemt en die „hetzelfde karakteristieke cyclo-pentano-perhydro-phenantreenskelet bezitten als de sterolen en de galzuren.”

Het zijn glucosiden, die in het plantenrijk voorkomen, „in waterige oplossing bij schudden sterke schuimvorming geven, in water goed oplosbaar zijn, in aether en chloroform echter uiterst weinig oplossen.”

De saponinen bezitten de eigenschap bloed te kunnen haemolysen; als glucosiden bevatten zij hexosen, pentosen, methylpentosen en glucuronzuur, naast een „genine” in hun molecule gebonden.^{o)}

Volgens WINDAUS zouden deze sapogeninen oxydatieproducten van sterolen zijn.

In een opstel over de huidige stand der digitalischemie geeft BLADERGROEN¹⁾ volgende recapitulatie van de oudere onderzoekingen, welke de *digitalis purpurea* als uitgangsmateriaal namen.

Hierin werden de volgende producten gevonden:

1 - Uit de bladeren geïsoleerde glucosiden met digitaliswerking.

a - *digitoxine*, in 1871 door *Nativelle* onder de naam van „*Digitaline cristallisée*”, vervolgens door SCHMIEDEBERG, WINDAUS en CLOETTA onder de naam van *digitoxine* geïsoleerd.

b - *gitoxine*, voor het eerst door KRAFT onder de naam

van anhydrogitaline, vervolgens door WINDAUS als gitoxine en door CLOETTA als *bigitaline* geïsoleerd.

c - gitaline (KRAFT, CLOETTA, WINDAUS); tot heden is dit glucoside alleen uit *digitalis purpurea* geïsoleerd.

- 2 - Uit de bladeren geïsoleerde, min of meer goed gedefinieerde glucosidenmengsels.

a - amorf digitaline = onzuiver digitoxine.

b - digitine (Nativelle), waarschijnlijk een mengsel van digitonine en gitogenine.

c - amorf digitaleïne (Nativelle).

- 3 - Uit het zaad geïsoleerde glucosiden met digitaliswerking; digitaverine (KILIANI).

- 4 - Uit het zaad geïsoleerde glucosiden, zonder digitaliswerking.

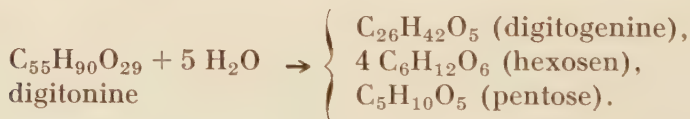
a - digitonine (SCHMIEDEBERG, KILIANI),

b - gitonine (WINDAUS, SCHNECKENBURGER).

Het *digitonine*, dat SCHMIEDEBERG²⁾ in het zaad van *digitalis purpurea* ontdekte, is een *glucoside*.

Een onderzoek naar de wijze, waarop deze glucosiden zijn opgebouwd, werd verricht door WINDAUS.³⁾

Het digitonine geeft volgens BLADERGROEN¹⁾ met zoutzuur in aanwezigheid van alcohol volgende hydrolyseproducten.

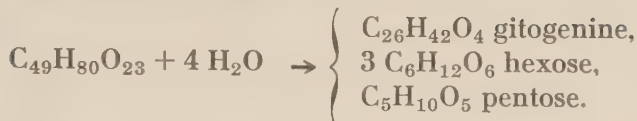


Van de 4 hexosemoleculen zijn er twee *glucose*- en 2 *galactose*-moleculen; de afgescheiden pentose is *l. xylose*.

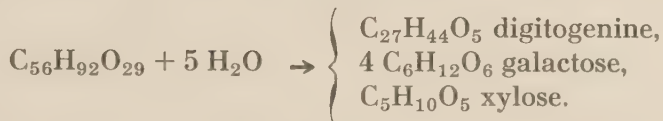
Het viel mij op, dat hier als empirische formule van digitonine $\text{C}_{55}\text{H}_{90}\text{O}_{29}$ wordt opgegeven, terwijl in de door mij tot nu toe geraadpleegde hand- en laboratoriumboeken als formule $\text{C}_{55}\text{H}_{94}\text{O}_{28}$ genoemd wordt.

Naast digitonine komt in hetzelfde zaad steeds het reeds genoemde *gitonine* voor, dat door WINDAUS en SCHNECKENBURGER⁴⁾ voor het eerst geïsoleerd werd.

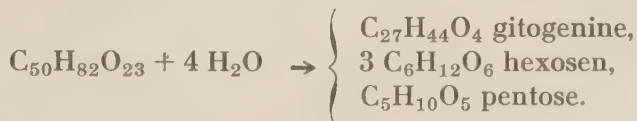
Deze stof levert bij hydrolyse:



LETTRE en INHOFFEN ⁰⁾ kennen aan *digitonine* de formule $\text{C}_{56}\text{H}_{92}\text{O}_{29}$ toe en laten bij hydrolyse volgende stoffen ontstaan:



Aan *gitonine* de formule $\text{C}_{50}\text{H}_{82}\text{O}_{23}$, dat de volgende hydrolyse zou ondergaan:



Evenals digitonine geeft gitonine met cholesterol een onoplosbare dubbelverbinding; ook met andere alcoholen geven deze stoffen neerslagen ⁸⁾, o.a. met

amylalcoholen,	phenol,
butyl „	thiophenol,
geraniol,	carvomenthol.

Nu is volgens BLADERGROEN ¹⁾ „het digitonine” van de handel bijna steeds een mengsel van digitonine en gitonine.

Om mij omtrent de zuiverheid van het digitonine „Merck” zekerheid te verschaffen, heb ik mij om inlichtingen tot genoemde firma gewend; volgend antwoord mocht ik ontvangen:

- 1 - dat digitonine nog sporen gitonine bevat en geringe hoeveelheden andere saponinen van onbekende samenstelling,
- 2 - dat een absoluut zuiver digitonine niet geleverd kan worden vanwege de hoge bereidingskosten,

3 - dat proeven ter bereiding van „völlig einheitlichen Digitonins” door WINDAUS beschreven werden.

(Zschr. phys. Chem. 150-206-1925).

LETTRE en INHOFFEN^{o)} geven als gemiddelde samenstelling van het handelsdigitonine op:

70-80 % digitonine,
10-20 % gitonine,
5-15 % andere saponinen,

welke opgave niet zeer geruststellend luidt.

Hess en DAM (IIB) merkten reeds op, dat de gevonden hoeveelheden cholesterol, gravimetrisch bepaald, afhankelijk waren van de gebruikte digitoninezendingen; een ijking van dit preparaat met zuiver cholesterol heette aanbeveling te verdienen.

Nog afgezien van de molecuulairformules, die LETTRE en INHOFFEN voor digitonine en gitonine opgeven, verdienen dus twee feiten bij de cholesterolbepaling, waarbij van digitonine gebruik gemaakt wordt, onze aandacht:

- 1 - dat twee formules voor digitonine aangenomen worden,
n.l. $C_{55}H_{94}O_{28}$, de meest gebruikelijke,
 $C_{55}H_{90}O_{29}$, volgens BLADERGROEN;
- 2 - dat het digitonine, zij het $C_{55}H_{94}O_{28}$ of $C_{55}H_{90}O_{29}$, verontreinigd is met gitonine $C_{49}H_{80}O_{23}$.

Afhankelijk van het onder 1 genoemde kan het molecuulairgewicht van choldig zijn:

1589 of 1601,

welk verschil bij de berekening van het cholesterol, uit de langs welke weg ook gemeten choldig-hoeveelheid, van invloed moet zijn.

Door de meer of mindere verontreiniging van het digitonine door gitonine, welke mogelijkheid onder 2 genoemd is, kan het moleculairgewicht tussen wijdere grenzen schommelen:

$$\begin{array}{l} \text{Choldig van } C_{55}H_{94}O_{28} = 1589 \\ \text{Choldig van } C_{55}H_{90}O_{29} = 1601 \\ \text{Choldig van } C_{49}H_{80}O_{23} = 1423; \end{array} \quad \left. \vphantom{\begin{array}{l} C_{55}H_{94}O_{28} \\ C_{55}H_{90}O_{29} \\ C_{49}H_{80}O_{23} \end{array}} \right\} \text{ gemiddeld 1595;}$$

dus tussen: 1423 en 1595.

Afhankelijk van deze verontreiniging van het digitonine met gitonine kan de fout, die men bij de berekening maakt, variëren bij:

a - de *gravimetrie* tussen 0 en 12 %,

b - de *oxydimetrische methode* tussen 0 en 5 %.

Deze laatste grenzen kan men berekenen uit de verbrandingsvergelijkingen van de mogelijke verschillende choldig-samenstellingen, welke becijferingen ik om hun omslachtigheid heb weggelaten.

De kwestie van de verontreiniging van het digitonine en het verschil in opvatting over de formule van deze stof komt mij om redenen van wetenschappelijke aard zeer belangrijk voor; het heeft iets onbevredigends met een stof te moeten werken, waarvan men, wat de samenstelling betreft, niet volkomen zeker is.

Dat de contrôleproeven in de gegeven bepalingen echter vrij nauwkeurig uitvallen, soms zelfs zulke verrassend kloppende resultaten te zien geven, is m.i. een aanwijzing voor het feit, dat de proeffouten in de verrichte onderzoekingen binnen die grenzen liggen, waar de onzuiverheid en betwijfelde digitoninesamenstelling geen rol van betekenis spelen.

Om wille van de lengte van deze dissertatie heb ik van een verder onderzoek afgezien, alhoewel ik hoop later hieromtrent mijn onderzoek te kunnen voortzetten.

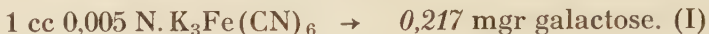
Tenslotte zou men zich kunnen afvragen of de factor van RAPPAORT:

1 cc 0,005 N. $K_3Fe(CN)_6 \rightarrow$ 0,115 mgr cholesterol,
behalve empirisch, ook theoretisch juist is.

Volgens FUJITA-IWATAKE geldt

1 cc 0,005 N. $K_3Fe(CN)_6 \rightarrow$ 0,174 mgr glucose.

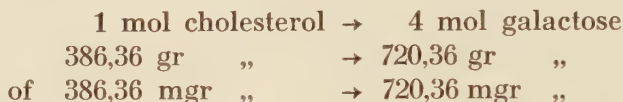
Daar de reductiewaarde van glucose volgens deze hexose-bepaling $1,25 \times$ zo groot is als die van galactose, m.a.w. 100 mgr galactose evenveel roodbloedloogzoutoplossing reduceren als 80 mgr glucose, komt dus:



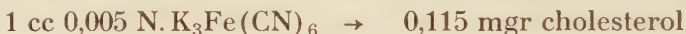
1 mol digitonine bindt 1 mol cholesterol.

Bij hydrolyse komen uit 1 mol digitonine 4 molen hexosen *) (galactose) vrij ^o)

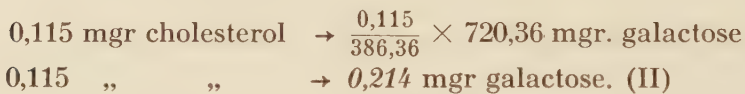
dus:



Daar volgens RAPPAPORT:



volgt hieruit, dat:



Aannemende, dat de hexosen, die in digitonine gebonden zijn, uitsluitend galactosemoleculen zijn, ziet men hieruit, dat de waarden I en II goed overeenstemmen.

Berekening en bepaling leiden dus tot dezelfde uitkomst:



§ 2 - Over de additie van digitonine aan choldig.

Bij het hoofdstuk over de gravimetrie hebben wij gesproken over de reactie:



en ten dele aangenomen, dat het verkregen neerslag uitsluitend zou bestaan uit zuiver cholesterol-digitonide.

Volgens BELCHOV⁵⁾ verbindt cholesterol zich in geconcentreerde oplossing met saponinen (digitonine) inderdaad als door WINDAUS in zijn schema wordt aangegeven; wordt de

*) Volgens BLADERGROEN¹⁾ zijn uit digitonine 2 moleculen glucose en 2 moleculen galactose vrij te maken.

reactie echter uitgevoerd in verdunde cholesteroloplossingen (alcohol), dan heeft de binding van het toegevoegde digitonine niet stoechiometrisch plaats, maar door adsorptie, waardoor de te binden hoeveelheid digitonine van verschillende factoren afhankelijk kan zijn.

Post⁶⁾ vermeldt een geval, waarin hij voor de „neutralisatie” van 3 delen saponine 40 delen cholesterol nodig had. „Colloïdaal opgelost cholesterol bindt,” zo zegt hij, „grotere hoeveelheden saponine dan moleculair of waar opgelost cholesterol.”

In een *ware*, alcoholische oplossing van cholesterol, waarin men het cholesterol als moleculair gedispergeerd mag beschouwen, zal een eveneens alcoholische digitonine-oplossing een neerslag doen ontstaan, waarvan de primaire deeltjes opgebouwd zijn uit één molecule cholesterol en één molecule digitonine. Dit zal dus het verlangde choldigneerslag zijn.

Het is echter niet uitgesloten, dat aan de secundair gevormde deeltjes in mindere of meerdere mate digitonine wordt geassocieerd; klaarblijkelijk is deze additie van digitonine in dit geval gering, daar bij de bepaling van zuiver cholesterol in oplossingen van bekende sterkte volgens verschillende methodes bijna theoretische uitkomsten verkregen worden.

Heeft men echter te doen met een cholesteroloplossing, die aan alcohol minder rijk is, dan is het aanwezige cholesterol niet meer in zijn geheel in *ware* oplossing, maar een deel hiervan, afhankelijk van de alcoholconcentratie, is als colloïdaal opgelost te beschouwen.

In dit geval heeft iets geheel anders plaats.

- 1 - Een klein deel van het cholesterol, n.l. die hoeveelheid, die zich in de peripherie van het colloïdale cholesteroldeeltje bevindt, zal nu slechts de *ware* additieverbinding (choldig) met het toegevoegde digitonine geven.

Hoe grover dispers het cholesterol dus in de onderzochte oplossing is, des te minder digitonine zal verbruikt worden om de eigenlijke choldigverbinding te geven.

- 2 - Een tweede niet te onderschatten reactie zal nu echter bovendien plaats grijpen; aan de cholesteroldeeltjes,

aan de buitenzijde door de eerste reactie bezet met choldigmoleculen, kan nu digitonine door additie gebonden worden. De grootte van deze additie, dus hoeveel digitonine bij deze tweede reactie gebonden wordt, zal nu uiteindelijk afhangen van de dispersiteitsgraad van de oorspronkelijke cholesteroloplossing.

De questies, die hierboven in kwalitatieve zin beschouwd werden, zijn m.i. van het grootste belang bij de bepalingen van cholesterol, die op het neerslaan van deze stof met digitonine berusten.

Het zal dus, afhankelijk van de hoeveelheid cholesterol, die in een bepaald serumextract te bepalen is, verschil maken, hoeveel digitonine gebonden of geadsorbeerd wordt.

Tevens zal het voor een bepaalde digitonine-methode van belang zijn steeds een even grote hoeveelheid serum met het alcohol-aether-mengsel te onteiwitten; indien men de ene maal meer serum gebruikt dan een andere keer, zal het serum-extract in het eerste geval meer water bevatten dan in het tweede geval. Hoe meer water in het extract aanwezig is, des te grover zal de dispersiteit van het aanwezige cholesterol zijn, althans bij matige verdunning. Constante uitvoering der bepalingen is dus eerste vereiste; de adsorptie van digitonine aan het ontstane choldigneerslag is hiervan te zeer afhankelijk.

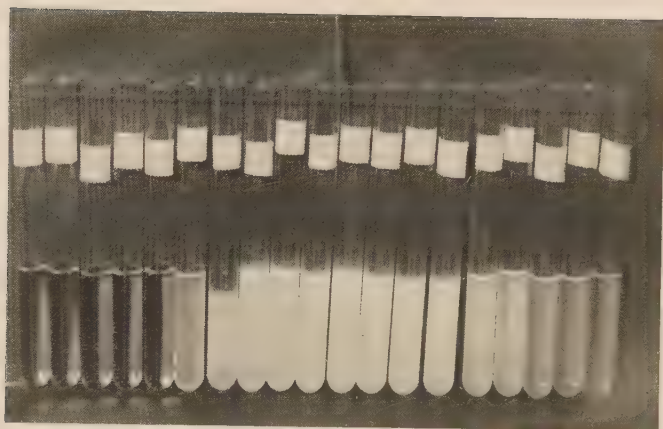
Hierbij komt nog, dat er geen evenredigheid blijkt te bestaan tussen de alcoholconcentratie van een cholesterol-oplossing en de dispersiteit van het opgeloste cholesterol.

Onderstaande verdunningsreeks geeft hiervan een benaderend beeld. Ook door uitgieten van een cholesteroloplossing in aceton in water verkrijgt men een betrekkelijk bestendige colloïdale oplossing. 7)

Uitgegaan werd van een cholesteroloplossing, die 100 mgr cholesterol in 100 cc 95 %-ige alcohol bevatte.

TABEL XXIII

Cholesterol oplossing:	Toegevoegd water:	Beoordeling na 2 uur:
9,5 cc	0,5 cc	
9,0 „	1,0 „	waterheldere vloeistof.
8,5 „	1,5 „	
8,0 „	2,0 „	



Cholesterol oplossing:	Toegevoegd water:	Beoordeling na 2 uur:
7,9 cc	2,1 cc	
7,8 „	2,2 „	hoe meer water, hoe troebeler dus, hoe grover dispers het cholesterol.
7,7 „	2,3 „	
7,6 „	2,4 „	
7,5 cc	2,5 cc	
7,0 „	3,0 „	afnemende troebeling, dus hoe meer water hoe fijner dispers (col- loïdale oplossing).
6,5 „	3,5 „	
6,0 „	4,0 „	
5,9 cc	4,1 cc	
5,8 „	4,2 „	de vloeistof wordt steeds helderder, m.a.w. de dispersiteit der cho- lesteroldeeltjes stijgt.
5,7 „	4,3 „	
5,6 „	4,4 „	
5,5 cc	4,5 cc	
5,0 „	5,0 „	de geringe troebeling heeft een con- stante grootte gekregen.
4,0 „	6,0 „	

Na een bepaalde toevoeging van water aan de alcoholische cholesteroloplossing krijgt men te doen met zichtbaar colloïdale oplossingen, waarvan de dispersiteit bij verder verdunnen afneemt. Ten slotte neemt de dispersiteit, wanneer nog meer water wordt toegevoegd, weer toe tot een bepaalde, ogenschijnlijk niet meer veranderende, grootte.

Opgemerkt dient echter te worden, dat de concentratie van het cholesterol in de bovengenoemde verdunningen steeds afneemt, hetgeen natuurlijk wel van invloed zal zijn op het verkregen resultaat.

Het zou m.i. zeer de moeite waard zijn de boven aangehaalde waarnemingen quantitatief te onderzoeken, hetgeen ik mij dan ook voorstel in de toekomst te doen.

LITERATUUR

- 0) H. LETTRÉ en H. INHOFFEN. „Über Sterine, Gallensäure und verwandte Naturstoffe“.
- 1) W. BLADERGROEN. „Over den huidigen stand der digitalis-chemie“. *Chem. Weekbl.* 47-674-1934.
- 2) SCHMIEDEBERG. *Arch. exp. Path.* 3-16-1875.
SCHMIEDEBERG. „Die Chemie und Pharmakologie des Fingerhutes“. *Pharm. Zentr. Hefte* 453-1929.
- 3) A. WINDAUS. Göttingen 1927. *Nachr. Ges. Wiss.*
- 4) A. WINDAUS. *Ber. dtsh. Chem. Ges.* 46-2628-1913.
- 5) N. BELCHOV. *J. phys. et path. gén.* 21-334-1923.
- 6) K. POST. *Arch. klin. Med.* 100-259-1910.
- 7) PORGES en NEUBAUER. *Bioch. Zschr.* 7-152-1908.
- 8) WINDAUS en WEINHOLD. *Zschr. physiol. Chem.* 126-299-1923.

SAMENVATTING

Achtereenvolgens werd door mij nagegaan langs welke verschillende wegen het cholesterol en zijn esters in bloedserum kan worden bepaald; aandacht werd besteed aan de mededelingen in de literatuur, die over de diverse bepalingsmethoden verschenen zijn. Deze verschillende methoden werden kritisch met elkander vergeleken, terwijl daarenboven een drietal werkwijzen werd gegeven, waarbij mij in de praktijk gebleken is, dat de cholesterolfracties in serum betrouwbaar kunnen worden bepaald.

Persoonlijk heb ik mezelf de vraag voorgelegd, welke methodiek de voorkeur verdient, de colorimetrische of een der methoden, die berusten op het neerslaan van cholesterol door middel van digitonine.

Verreweg de meeste colorimetrische methoden, die gepubliceerd werden, zijn om hun onnauwkeurigheid niet bruikbaar voor wetenschappelijk onderzoek; voor de praktijk van de kliniek, waar het meer aankomt op het bepalen van een drempelwaarde dan op een volkomen betrouwbare analytische uitkomst, zijn er enkele, die door hun eenvoud en reproduceerbaarheid als doelmatig aan te bevelen zijn; van waarde is echter, dat steeds dezelfde modificatie van de bepaling wordt toegepast en geen vergelijkende studie wordt verricht met uitkomsten, die langs een andere weg verkregen zijn.

De methoden, die bij de kleurvergelijking gebruik maken van de Stufen-photometer, zijn verre verkieslijk boven die, welke de standaardkleur en de te meten kleur met elkander in een gewone colorimeter vergelijken.

Wat de digitoninemethoden betreft, moet het volgende opgemerkt worden: Indien digitonine met cholesterol steeds, onder welke omstandigheden dan ook, de moleculaire dubbel-

verbinding choldig zou opleveren, dan zouden deze methoden veel betrouwbaarder zijn dan de colorimetrische. Afhankelijk van de dispersiteit van het cholesterol en de aanwezige hoeveelheid digitonine varieert echter de samenstelling van het choldigneerslag.

Dit moet eensdeels aan de adsorptie van digitonine aan het neerslag, anderdeels aan de inwendige bouw van het neerslag geweten worden. Hierom is het moeilijk te zeggen of in het algemeen de ene of de andere techniek de voorkeur verdient.

Sinds echter in de digitoninemethoden het wassen van het choldig-neerslag met overmaat heet water gebruikelijk is geworden, zijn deze methoden in betrouwbaarheid aanzienlijk gestegen.

Daar echter uit de literatuur blijkt, dat nog geen volledige overeenstemming over de formule van het digitonine zelf werd verkregen en de zuiverheid van deze stof uit de handel nog wel wat te wensen overlaat, ligt ook in deze feiten opgesloten, dat aan de digitoninemethoden nog geen volkomen betrouwbaarheid mag worden toegekend.

Dat bij de bepaling van cholesterol en zijn esters in serum de extractie van deze stoffen uit de genoemde vloeistof een belangrijke rol speelt, werd door mij aangetoond. Vele extratiemethoden in de literatuur vermeld, zijn voor nauwkeurig, quantitatief onderzoek niet aanbevelenswaardig; de extractie volgens Bloor met een bepaald mengsel van alcohol en aether verdient sterk de voorkeur.

De verzeeping van de cholesterol esters, zowel in zuivere toestand als in serum aanwezig, werd aan een nader onderzoek onderworpen, waaruit bleek, dat Na-aethylaat een betrouwbaar verzeepingsmiddel is en de voorkeur verdient boven andere.

DEEL II

MEDISCHE ONDERZOEKINGEN
OVER CHOLESTEROL

In het eerste deel van deze dissertatie werd door mij uitvoerig ingegaan op de verschillende bepalingsmethoden van cholesterol in bloedserum, die in de praktijk toepassing gevonden hebben; daarenboven werden questies, die ten nauwste met deze bepalingen samenhangen, zoals de extractie van dit lipoïd uit serum en de verzeping van zijn esters, aan een nader onderzoek onderworpen.

Op dit analytisch gedeelte volgt nu een beschouwing over de veranderlijkheid van het evenwicht *veresterd cholesterol - totaal cholesterol* in bloedserum, terwijl tevens zal worden nagegaan of het positief of negatief uitvallen van de reactie van Takata-Ara verband houdt met een sterke daling van de cholesterolesters in bloed. (Estersturz)

HOOFDSTUK I

OVERZICHT OVER HET PROBLEEM VAN DE Z.G.N. ESTERSTURZ

In bloed komt het cholesterol zowel in vrije toestand als in de vorm van esters voor; de rode bloedlichaampjes bevatten bijna uitsluitend vrij cholesterol, terwijl in het serum onder normale omstandigheden het overgrote deel van het aanwezige cholesterol veresterd is.

WACKER en HUECK⁵³⁾ delen mede, dat de erythrocyten 0,112 % vrij- en 0,0043 % veresterd cholesterol bevatten, terwijl voor de witte bloedlichaampjes de hoeveelheden bedragen: 0,52 % vrij cholesterol en 0,0013 % ester.

Welk deel van de totale cholesterol-hoeveelheid in het serum in de vorm van esters aanwezig is, daarover lopen de meningen vrij sterk uiteen.

GARDNER en GAINSBOROUGH¹⁾ delen als grenzen 45-95 % mede; van een constante verhouding is dus volgens hen geen sprake, alhoewel opgemerkt dient te worden, dat zij hun bloedonderzoek verrichtten bij personen, die niet nuchter waren.

Ook PETERS en VAN SLIJKE²⁾ namen grote schommelingen in de esterhoeveelheid waar; normaal is volgens deze onderzoekers in plasma een esterpercentage, dat tussen 40-70 % schommelt.

Volgens BLOCH³⁾ en SCHAAF⁴⁾ is 70 % van de totale hoeveelheid cholesterol veresterd.

BÜRGER en HABS⁶⁾ namen bij patiënten, die leden aan ziekten, die geen invloed op de cholesterolstofwisseling uitoefenen, esterhoeveelheden waar, die 50-84 % van de totale hoeveelheid cholesterol bedroegen.

BLOOR en KNUDSON⁷⁾ constateren in normaal serum een constante verhouding; in totaal bloed is volgens hen 33,5 % van het cholesterol als alcohol aanwezig.

ROSEN en KRASNOW⁸⁾ bepaalden bij 25 normale personen het bloedcholesterol en vonden dat gemiddeld in het serum 28 % in vrije toestand, dus ± 70 % als ester aanwezig was.

THANNHAUSER⁹⁾ zegt, dat „in serum het gehalte aan cholesterolsters ongeveer tweemaal zo groot is als het gehalte aan vrij cholesterol,” dus ± 70 %.

EPSTEIN vindt als grenzen, waartussen het esterpercentage in serum van normale personen ligt, 50-70 %.

Deze en andere mededelingen in de literatuur wijzen er op, dat het esterpercentage in serum van normale personen zal liggen tussen 50-70 %; dit wil echter niet zeggen, dat afwijkingen van dit gehalte in alle gevallen als pathologisch beschouwd moeten worden.

POLANO⁵⁾ stelde zich in zijn dissertatie de vraag: „wat is het normale gehalte aan cholesterol in menselijk bloed?,” omdat in de literatuur hierop geen afdoend antwoord was te vinden.

In 20 normale gevallen vond hij voor plasma een gemiddelde van ongeveer 205 mgr %, waarbij echter een bepaling van de twee verschillende fracties niet werd verricht.

Door mij werd eveneens bij normale personen het cholesterolgehalte van het serum bepaald en wel de beide fracties; de venaepunctie werd in nuchtere toestand verricht.

Totaal cholesterol:	Vrij cholesterol:	Veresterd cholesterol:	Ester- percentage:
216 mgr %	63 mgr %	153 mgr %	71 %
182 „	86 „	96 „	53 „
196 „	71 „	125 „	64 „
220 „	79 „	141 „	64 „
179 „	56 „	123 „	69 „
189 „	81 „	108 „	57 „
199 „	87 „	112 „	56 „
208 „	110 „	98 „	47 „
215 „	73 „	142 „	66 „
209 „	82 „	127 „	61 „
225 „	122 „	103 „	46 „
208 „	85 „	123 „	59 „
179 „	56 „	123 „	63 „
211 „	74 „	137 „	65 „
207 „	85 „	122 „	59 „

Het esterpercentage in serum blijkt dus te schommelen tussen 50 en 70 %, in overeenstemming met de resultaten van andere onderzoekers.

De bepalingen werden volgens de oxydimetrische methode verricht.

DENIS ¹¹⁾ kent geen waarde toe aan de cholesterolbepaling in bloed, wat betreft „the clinical diagnosis or prognosis of disease”. Eenzelfde standpunt als DENIS neemt BRANDES ¹²⁾ in. Dat de mening van deze onderzoekers lang niet meer gedeeld wordt, blijkt duidelijk uit de mededelingen, die over het bloed-cholesterol in de literatuur verschenen zijn. KOZES ¹³⁾ b.v., die in een groot aantal ziektegevallen (± 270) de cholesterol-fracties van het bloed bepaalde, zegt, dat het cholesterol-gehalte hiervan voor verschillende groepen van ziekten karakteristieke waarden te zien geeft, zodat bepaling van dit lipoid in het bloed als een goed diagnostisch hulpmiddel toegepast kan worden; meerdere dergelijke opmerkingen zouden te noemen zijn.

Alvorens nu verder te gaan, behoort eerst te worden vastgesteld wat men onder het begrip „*Estersturz*” verstaan moet.

Neemt in bloedserum de esterfractie zeer belangrijk af ten opzichte van de hoeveelheid vrij cholesterol, dan spreekt men in navolging van THANNHAUSER en SCHABER van *Estersturz*; verdwijnt de hoeveelheid cholesterolsters bijna geheel, dan zou men dit kunnen aanduiden met *Esterschwund*.

Van de hand van THANNHAUSER en SCHABER ¹⁴⁾ verscheen over deze kwestie een belangrijke mededeling:

„De lever scheidt slechts vrij cholesterol af; in de galstenen wordt daarom alleen vrij cholesterol aangetroffen. De lever en de huidklieren zijn de enige organen, die onder normale omstandigheden cholesterol afscheiden; de lever speelt echter, wat de hoeveelheid betreft, de hoofdrol in de stofwisseling van het cholesterol.

Daar de lever door zijn fermentatieve eigenschappen alleen vrij cholesterol in de gal afvoert, is het dus aannemelijk dat een gestoorde leverfunctie zich niet zozeer zal doen leren kennen in een grote vermeerdering van de totale cholesterol-hoeveelheid van het bloed als wel in een verstoring van het evenwicht vrij cholesterol/cholesterolsters.”

Zij onderzochten het bloed van lijdens aan leverziekten en vergeleken de verkregen waarden met die van andere zieken, in het bijzonder van nierpatienten. Hierbij is ook een stoornis der cholesterolstofwisseling te verwachten en wel een vermeerdering der totale hoeveelheid cholesterol. Bij deze nierpatienten mocht echter verondersteld worden, dat het leverparenchym niet beschadigd was.

Zij konden aantonen, dat in serum van patienten met chronische nierziekten of met ziekten van de pancreas geen noemenswaardige verschuiving in het cholesterol/cholesterolester-evenwicht was opgetreden. In serum van patienten echter, die leden aan een beschadiging van het leverparenchym, werd een absolute en relatieve stijging van het vrije cholesterol waargenomen; gelijktijdig was bij diezelfde patienten de esterhoeveelheid geringer dan normaal en bij sommige zelfs waren de cholesterolesters totaal uit het serum verdwenen.

De totale cholesterolhoeveelheid was in de meeste gevallen van leverziekten niet gestegen; een overeenkomstige waarneming werd door BÜRGER bij patienten met stuwingsicterus opgetekend.

Het zijn THANNHAUSER en SCHABER geweest, die voor de eerste maal hebben aangetoond, dat het evenwicht der beide cholesterolfracties bij leverparenchymbeschadiging gewijzigd wordt en wel ten gunste van het vrije cholesterol; zij komen op grond van het resultaat van hun onderzoek tot de gevolgtrekking, dat aan de lever een beslissende rol moet worden toegekend, wat de regulering van dit evenwicht betreft.¹⁵⁾

THANNHAUSER zegt dan ook: „In het bovenstaande hebben wij naar voren gebracht, dat de lever alleen vrij cholesterol in de gal afscheidt en men zou kunnen geloven, dat de verschuiving naar de kant van het vrije cholesterol een storing in de afscheiding van het cholesterol betekent, die door de beschadiging van het parenchym veroorzaakt wordt.”

„Indien deze opvatting juist zou zijn, dan zou tegelijkertijd met de verandering van het quotient vrij cholesterol/cholesterolesters ook een vermeerdering van de totale hoeveelheid cholesterol moeten optreden.”

„Een vermeerdering van het totale cholesterol kon echter alleen bij patienten met sterke galstuwung worden vastgesteld.”

Het komt beide onderzoekers veel waarschijnlijker voor,

dat de genoemde quotientverandering moet geweten worden aan een verminderde werking van de in de lever aanwezige estersplitsende en estervormende fermenten.

THANNHAUSER¹⁶⁾ vond in duodenalsap, in pancreatin, zowel als in de gal, een ferment, dat in staat is cholesterolesters te verzeppen; daar dit ferment ook in de gal voorkomt, verklaart dit waarschijnlijk waarom alleen vrij cholesterol in deze vloeistof wordt aangetroffen.

De in de lever voorkomende fermenten schijnen bij alle beschadigingen van het leverparenchym in werkzaamheid achteruit te gaan. Dit feit zou de eigenaardige verschuiving van het evenwicht in de cholesterolfracties van het serum van sommige leverzieken kunnen verklaren, in het bijzonder het scherpe dalen van de esterhoeveelheid.

In de meest verschillende organen komen zowel cholesterol-ester-vormende als -splitsende fermenten voor, die door hun aanwezigheid het evenwicht tussen vrij- en gebonden cholesterol in de lichaamsvochten kunnen beïnvloeden; toch mag men volgens THANNHAUSER veronderstellen, dat de lever op de ligging van dit evenwicht een eerste rol zal spelen.

Deze overtuiging spreekt ook nog uit het volgende:

„Nemen wij op grond van stofwisselingsproeven bij Xanthomatosen aan, dat een secretiestoornis van het cholesterol opgetreden is, dan is bij Xanthomen van de huid en ook bij die in de ziekte van Schüller-Christian de grootste hoeveelheid van het geretineerde cholesterol als ester aanwezig.”

Wordt echter ook Xanthoomvorming in de lever waargenomen, dan kan deze in het verdere verloop van de ziekte een ernstige functionele beschadiging veroorzaken.

„Nu zal, evenals bij alle andere parenchymateuse veranderingen van de lever, de functie van de lever om cholesterol te veresteren lijden en het door de storing in de afscheiding geretineerde cholesterol zal dan ook niet meer als ester, maar als vrij cholesterol aan de dag treden.”

„Wij zouden willen aannemen, dat aan de meeste Xanthomatosen een stoornis in de afscheiding van het cholesterol ten grondslag ligt. Bij een gezonde lever bevindt zich bij deze ziekte het cholesterol overwegend in de vorm van esters in de lichaamsvochten. Ondergaat echter de lever ook xantho-

mateuze veranderingen, dan zal, al naargelang de ernst van de leverbeschadiging en de duur van de leverziekte, de verestering van het „durch die Grundkrankheit retinierten” cholesterol nu nog maar onvoldoende plaats vinden.”

Dat THANNHAUSER veel verwacht van de bepaling van het esterpercentage van de totale cholesterolhoeveelheid blijkt wel uit zijn woorden, dat „het aan latere onderzoeken mag weggelegd zijn te achterhalen of men in plaats van tijdrovende functieproeven van de lever eenvoudig de verhouding vrij cholesterol/cholesterolesters te bepalen heeft en uit een daling van de esterhoeveelheid tot een ziekte van het leverparenchym besluiten kan.”

Om een beter inzicht in de stofwisseling van het cholesterol te verkrijgen, verrichtte BÜRGER¹⁷⁾ met deze stof belastingsproeven. Op de nuchtere maag ontvingen de proefpersonen 5 gram cholesterol, die in 100 gram olijfolie waren opgelost.

Zowel het vrije- als het veresterde cholesterol werd in het serum van de nuchtere personen bepaald en daarenboven 4, 8 en 24 uur na het tijdstip, dat het cholesterol genuttigd was. Naar de mening van BÜRGER heeft de curve, die de verhouding vrij cholesterol/veresterd cholesterol voorstelt, een typisch verloop; wijkt de opgestelde curve af van de normale, dan zou een leverbeschadiging mogen worden aangenomen.

(POLANO)

In een geval, waarbij URBACH van deze leverbelastingproef gebruik maakte, vond hij, dat zowel bij de patient als bij de normale contrôlepersoon de door BÜRGER vereiste alimentaire hypercholesterolaemie achterwege bleef.

„Bei Deutung der Ergebnisse der Cholesterin Belastungs-Versuche ist jedenfalls allergrößte Vorsicht geboten.”

(URBACH)

In aansluiting met deze verklaring en vooruitlopende op hetgeen verder nog tegen de voedingsproeven van BÜRGER pleiten zal, zegt POLANO⁵⁾: „De hoop, dat wij in de cholesterol-belastingcurve een diagnosticum van de waarde van de bloedsuiker in handen zouden hebben, is tot dusverre ijdel gebleken.”

BÜRGER en HABS¹⁸⁾ menen, in overeenstemming met de

resultaten van BÜRGER en BEUMER¹⁹⁾, FEIGL²⁰⁾ en STEPP²¹⁾, dat het tot een terugkeren van het cholesterol in bloed komt, wanneer de galafscheiding gestoord is; zij staven hun mening door de uitslag van de boven aangegeven cholesterolbelastingsproeven als bewijs aan te halen.

In 7 gevallen van levercirrhose (waarschijnlijke parenchymbeschadiging), waarvan er 4 later histologisch bewezen werden, trad na een gift van 5 gram cholesterol in 100 gram olijfolie geen alimentaire lipaemie, noch een alimentaire hypercholesterolaemie op. In 5 andere gevallen van levercirrhose werd door BÜRGER en WINTERSEEL²²⁾ hetzelfde waargenomen.

In een ander onderzoek vermeldt BÜRGER het resultaat van een serumonderzoek bij patienten, eveneens lijdende aan levercirrhose, waaruit blijkt, dat in 5 gevallen van deze ziekte *zonder* icterus de cholesterolhoeveelheid in het serum normaal was, althans niet verlaagd, terwijl in 4 van 6 onderzochte gevallen van levercirrhose *met* icterus van een vermindering der esterhoeveelheid in meer of minder belangrijke mate sprake was.

BÜRGER en HABS²³⁾ komen dan tot de volgende conclusies:

- 1e - Bij alle leverziekten, die tot afsluiting voeren van de galwegen naar de darm, komt het tot een z.g.n. retentiehypercholesterolaemie.
- 2e - Deze is in werkelijkheid door een eenzijdige toename van het vrije cholesterol bepaald, waaruit dan een relatieve vermindering van de esterhoeveelheid voortvloeit.
- 3e - Er komen bij levercirrhoses gevallen van een relatieve, doch ook van een absolute vermindering der cholesterolesters voor.
- 4e - Als gevolg hiervan kan men uit het percentage der cholesterolesters in het serum geen zekere besluiten trekken over de functionering van de lever.¹⁸⁾

BÜRGER²⁴⁾ meent, dat de cholaemische hypercholesterolaemie bestaat in een toename van het vrije cholesterol ten koste van de cholesterolesters; het komt evenwel ook voor, dat de esterhoeveelheid op zichzelf verminderd is.

Bij alle soorten van levercirrhoses heeft men te doen met een ernstige stoornis van de cholesterolresorptie, die door het uitblijven van een alimentaire lipaemie (BÜRGER) gekarakteriseerd wordt.²⁵⁾

Door pathologische oorzaken gevormde minderwaardige gal — of het geheel of ten dele ontbreken hiervan — zou dus volgens BÜRGER een stoornis in de resorptie der vetten en lipoïden veroorzaken, tengevolge waarvan de Estersturz zou ontstaan.

Bij een deel van de patienten van THANNHAUSER, waarbij Estersturz geconstateerd werd, bestond echter geen icterus en was geen stoornis in de resorptie der vetten opgetreden; deze waarnemingen maken de theorie van BÜRGER over de Estersturz moeilijk aanvaardbaar.

In de besproken ziektegevallen van THANNHAUSER en SCHABER werd daarentegen wel een beschadiging van het leverparenchym opgemerkt, hetgeen een grote steun is voor hun opvatting, dat de zieke lever niet in staat is een zodanige fermentatieve arbeid te verrichten, dat het evenwicht cholesterol / cholesteroesters in serum in stand gehouden wordt.

BÜRGER merkt naar aanleiding van deze mededelingen op, dat de getallen, waarmede THANNHAUSER en SCHABER hun hypothese over de Estersturz trachten te ondersteunen, „in zoverre moeilijk te verklaren zijn, dat de onderzoekers in 11 gevallen van leverziekten viermaal bij onderzoeken van het totaal-bloed de cholesteroesters volkomen afwezig zien, terwijl het gelijktijdig onderzochte serum aanzienlijke hoeveelheden esters bevat.”

Wanneer van een patient inderdaad tegelijkertijd het bloed zowel als het serum op cholesteroesters onderzocht wordt, dan moet ook naar mijn mening het bloed, indien in het serum geen esters worden aangetroffen, vrij van deze verbindingen zijn; de erythrocyten bevatten practisch geen cholesteroesters, maar alleen vrij cholesterol.

Aan de hypothese, die de Estersturz bij parenchymbeschadiging van de lever door een verminderde fermentwerking wil verklaren, doet dit echter niets af; door zijn opmerking weerlegt BÜRGER de verklaringswijze van zijn tegenstanders niet.

De belastingsproeven met cholesterol, waarover hierboven

gesproken werd en die door BÜRGER als testproef bij de diagnose van leverziekten aangewend werden, worden, behalve door URBACH, ook door anderen sterk becritiseerd.

Door BARREDA²⁶⁾ werden op instigatie van THANNHAUSER analoge voedingsproeven verricht; zij leverden geheel andere uitkomsten. BARREDA voerde zijn onderzoeken veel omvangrijker en systematischer uit, terwijl daarenboven de methode volgens welke deze onderzoeker de cholesterolfracties in het serum bepaalde, betrouwbaar was.

De cholesterolvoedingsproef van BARREDA had bij 18 gezonde personen tot resultaat, dat het serumcholesterol niet steeg tot die hoeveelheid, die door BÜRGER waargenomen werd; in sommige gevallen viel er zelfs een vermindering te constateren.

Overeenkomstige ervaringen hadden SNAPPER en PARISEL²⁷⁾ reeds vroeger bij patienten met en zonder stofwisselingsstoornissen gepubliceerd. (DE LANGEN, VERHOEF, SCHÖNHEIMER)

In het algemeen bleef bij de proeven van BARREDA²⁶⁾ de verhouding tussen vrij- en veresterd cholesterol in het serum onveranderd (in overeenstemming met de resultaten van BÜRGER en HABS). De hoeveelheid cholesteroesters, in procenten van het totaal aanwezige cholesterol uitgedrukt, ligt in bijna alle gevallen binnen normale grenzen; in 3 gevallen echter (parenchymateuse icterus en carcinoom van de galwegen met icterus) werd Estersturz geconstateerd.

Voedingsproeven, als door BÜRGER en BARREDA beschreven, werden ook verricht door GARDNER en GAINSBOROUGH.¹⁾

„The level of the cholesterol content of human plasma taken while fasting, can be raised or lowered by feeding with diets of high or low cholesterol content. Such changes are most marked as regards the cholesteroesters, the free cholesterol remains practically constant; under certain conditions a marked disturbance of the free to ester cholesterol ratio is observed.”

(GARDNER²⁸⁾, ARNDT²⁹⁾, LUBINSKI en STERN³⁰⁾
ARNDT en MÜLLER³¹⁾ e.a.)

De schommelingen, zowel van de totale- als van de esterhoeveelheid, kunnen echter volgens GARDNER niet alleen door de toevoer van cholesterol uit de darm verklaard worden;

men moet tevens een actieve endogene stofwisseling van dit lipoid aannemen. Ziekten van de lever en de galwegen gaan bij optreden van icterus met stoornissen in de cholesterolstofwisseling gepaard; volgens THANNHAUSER (Parenchymbeschadiging) treedt dan in vele gevallen Estersturz op, volgens anderen niet.

GARDNER en GAINSBOROUGH ³²⁾ beschrijven later een onderzoek bij 35 patienten met gal- en leverziekten, waarbij de cholesterolfracties in het plasma werden bepaald.

Bij 18 patienten *met* icterus en afsluiting van de galwegen constateren zij in het begin een snelle daling van de esterhoeveelheid, terwijl de vrije hoeveelheid nagenoeg onveranderd blijft; als de afsluiting wordt opgeheven, is de verhouding der beide fracties weer snel normaal. Twee types vallen hier te onderscheiden:

- a* - waarbij het totaal cholesterol onveranderd bleef, doch de esters bijna geheel verdwenen waren (Estersturz),
- b* - waarbij men een hoog totaal-cholesterolgehalte waarnam, maar waarbij de esters sterk verminderd waren.

Daar de gal in de darm in deze gevallen zo goed als ontbreekt, worden vet en cholesterol slecht of niet geresorbeerd; de verklaring van de hier waargenomen Estersturz zou tot een vetstofwisselingsstoornis kunnen worden teruggebracht, (BÜRGER) alhoewel de hypothese van THANNHAUSER ook hier geldig schijnt.

STERN en SUCHANTKE ³³⁾ verklaren, dat „een beschadiging van het leverparenchym weliswaar (echter niet altijd) met veranderingen van de cholesterolspiegel in het bloed samen gaat, maar dat een stoornis van het esterevenwicht volstrekt niet regelmatig in zulke gevallen aangetroffen wordt.”

Zij nemen aan, dat de leverfunctie niet de enige factor is, waarvan de hoeveelheid van het bloedcholesterol afhankelijk is en dat de esterhoeveelheid in het bijzonder niet van de leverwerking alleen afhangt. ⁴⁸⁾

SUCHANTKE vermeldt slechts één geval van werkelijke Estersturz volgens THANNHAUSER (leverparenchymbeschadiging en acute gele leveratrofie); de ± 20 door STERN onderzochte gevallen zijn in uitkomst totaal verschillend met de resultaten, die THANNHAUSER en SCHABER mededelen; Estersturz werd niet waargenomen, ofschoon toch in alle gevallen van STERN lever-

parenchymbeschadiging geconstateerd was. Zelfs waren er 3 gevallen bij met atrophische levercirrhose en 2 met cirrhosis hepatis. ³⁴⁾

In een omvangrijk onderzoek door ADLER en LEMMEL verricht ³⁵⁾, waarin zij bij een groot aantal leverziekten de cholesterolfracties in het bloed bepaalden, treft men de volgende resultaten aan.

Bij mechanische icterus werd bij afsluiting van de galwegen naar de darm (door tumoren in de lever of in de galwegen) hypercholesterolaemie waargenomen; dit stemt met de gegevens van BÜRGER ³⁶⁾ overeen. De hoeveelheid cholesterol-esters vermindert in de meeste gevallen van galafsluiting door carcinoom in meerdere of mindere mate; of men hier echter wel van eigenlijke Estersturz kan spreken, is een andere kwestie.

Wanneer men te doen heeft met cholelithiasis onder choledochusafsluiting met stuwing, wordt een sterke vermindering der esters waargenomen, terwijl de totale cholesterolhoeveelheid zeer weinig veranderd is. (Estersturz)

„Dit scherpe dalen der esters kan misschien zo verklaard worden, dat een stuwing, die langere tijd aanhoudt, tot een beschadiging van het leverparenchym leidt, die zich dan openbaart in het ontbreken van het veresterend vermogen.”

Bij afsluiting van de galwegen door de aanwezigheid van tumoren zou hetzelfde kunnen gelden; de verklaring van het waargenomene zou dus kunnen steunen op de bekende fermenttheorie.

De opvatting van HUECK, dat het quotient vrij cholesterol / veresterd cholesterol door de lever in stand gehouden wordt, huldigen ADLER en LEMMEL blijkbaar ook; toch halen zij de ontkenning van ROSENTHAL en STERN van de opvatting van THANNHAUSER, als zou men in „een ontbreken van de verestering een beschadiging van het leverparenchym” mogen zien, tevens aan.

TAKUWA ³⁶⁾ vindt in het serum van patienten met leverziekten het percentage cholesterol-esters steeds verlaagd, in tegenstelling met de uitkomsten van vele andere onderzoekers; hij durft in deze waarneming zelfs een hulpmiddel zien voor

het stellen van diagnoses en er een beoordeling van de leverfunctie op bouwen.

ANDRES ³⁷⁾, die eveneens in de bepaling van de esters in bloed een middel ziet om de leverwerking te controleren, meent, dat de Estersturz een gevolg is van onvoldoende leverwerkzaamheid.

PETRYNOWSKI ³⁸⁾ nam bij sommige leverziekten, die gepaard gaan met lang aanhoudende icterus, sterke vermindering der cholesterolesters waar.

WENDT ³⁹⁾, die de verklaringen van THANNHAUSER en SCHABER en die van BÜRGER over de Estersturz aan een bespreking onderwerpt, ziet in beide theorieën veel dat tot een inzicht in het waargenomen verschijnsel zou kunnen leiden.

Hij neemt aan, dat de Estersturz, die in gevallen van stuwingsicterus optreedt, samenhangt met de in de gal aange-toonde esterase, die bij de overgang van de gal in het bloed de cholesterolesters verzeept.

Indien deze opvatting juist is, zou de hond, die in tegenstelling met de mens in de gal behalve vrij cholesterol ook esters afscheidt, in deze vloeistof geen cholesterolester-split-send ferment mogen bezitten. Icterus, door kunstmatig teweeg-gebrachte galafsluiting veroorzaakt, zou dus bij deze dieren niet tot Estersturz mogen voeren. Proeven leverden WENDT het bewijs, dat bij de hond in de gal inderdaad geen esterase aanwezig is.

WENDT betuigt zich voor de hierbovengenoemde gevallen in zekere opzichten een aanhanger van de verklaringswijze, die THANNHAUSER voor de Estersturz geeft.

In de gevallen van levercirrhose, waarbij slechts geringe icterus wordt waargenomen, meent WENDT de fermenttheorie niet te mogen aanvaarden.

Waarom zulks voor hem onmogelijk is, deelt hij niet mede. In deze laatste ziekte zal toch wel degelijk de fermentatieve werkzaamheid van de lever hebben geleden, waardoor het bekende quotient beïnvloed kan worden. Hij ziet echter voor deze gevallen in de opvatting van BÜRGER, die hier een ge-stoorde vetresorptie aanneemt, de bevredigendste verklaring.

MANCKE ⁴⁰⁾ doet mededeling van 134 cholesterolanalyses in

serum van 50 patienten, waarvan er 42 aan een leverziekte lijdende waren; in 3 gevallen van subacute leveratrophie nam hij een absolute esterafname, Estersturz, waar, zonder gelijk-tijdige vermeerdering van het vrije cholesterol.

Bij levercirrhoses treft STROEBE⁴¹⁾ geen uniformiteit aan in de verandering van het quotient vrij / veresterd cholesterol in serum; in de bepaling van dit quotient ligt voor hem dus niet het middel om bepaalde leverziekten te identificeren.

HEINLEIN⁴²⁾ betuigt zich in het verschijnsel van de Estersturz tot op zekere hoogte aanhanger van de fermenttheorie; hij zegt, dat de „regulerende werking van de lever op de cholesterolstofwisseling door de veranderingen in het cholesterolgehalte van het bloed bij leverziekten bewezen wordt.”

In 13 gevallen van cirrhose Laennec, die LAROCHE, GRIGAUT en COSTES⁴³⁾ onderzochten, is het quotient ester / totaal cholesterol normaal of slechts weinig lager dan 60 %; de laagst gevonden waarde bedroeg 39 %. In 9 gevallen ligt de waarde boven 50 %, in 6 andere zelfs boven 60 %. Hun resultaten zijn gelijklopend met die van ADLER en LEMMEL.³⁵⁾ Deze laatsten toonden aan, dat de Estersturz evenredig was met de ernst der onderzochte ziektegevallen, dat zij ontbrak bij de gewone cirrhoses en dat bij zieken, die leden aan subacute atrophie de esterhoeveelheid, hoewel zij enige tijd dalende was geweest, weer kon stijgen.

Als algemene conclusie van hun onderzoek, waarin zij geen eigenlijke Estersturz opmerkten, spreken LAROCHE en zijn medeonderzoekers als hun mening uit, dat de vermindering der esterhoeveelheid, en dus ook de wijziging van het quotient zou wijzen op een onvoldoend functioneren van de lever.

„De uitkomsten van klinische, therapeutische en experimentele onderzoekingen, die zij beschrijven in hun publicatie, stemmen met elkander overeen; zij tonen duidelijk aan, dat de lever de vorming van de cholesterolsters regelt.”

Zij laten er twijfel over bestaan of de verwachting van THANNHAUSER, dat men „uit een daling van de esterhoeveelheid tot een ziekte van het leverparenchym mag besluiten”, bewaarheid zal worden.

Huns inziens zijn slechts in gevallen, waarin van een uitgesproken Estersturz sprake is, conclusies over de diagnose

van een ziekte gewettigd; deze aanzienlijke verlagingen van de esterhoeveelheid treft men alleen aan in gevallen van ernstige icterus, waarbij het bloed bijna uitsluitend vrij cholesterol bevat. Of fermentwerkingen van de lever hierbij een betekenende rol zouden spelen, delen zij niet mede.

In een reeds vroeger aangehaald onderzoek van KOZES¹³⁾ vermeldt deze, dat in 5 van 6 gevallen van levercirrhose *met* icterus het cholesterolsterpercentage 30 % of lager was; in 1 geval bedroeg de hoeveelheid zelfs maar 16 %. Hier is dus, — KOZES zelf heeft hierop niet gewezen, daar dit begrip toen nog niet gedefinieerd was, — in meerdere of mindere mate sprake van Estersturz.

SARMENTO en DA COSTA⁴⁴⁾, die het quotient bij vele leverpatienten bepaalden, nemen aan, dat bij atrophische cirrhoses het vermogen van de lever om cholesterol te veresteren behouden blijft; hetzelfde nemen zij aan in gevallen, waar galstenen en stuwingslever te constateren vallen.

EPSTEIN⁴⁵⁾, die als normale hoeveelheid veresterd cholesterol 50-70 % van het totaal opgeeft, vond in 4 gevallen van atrophische levercirrhose het esterpercentage normaal. In 10 gevallen van diffuse parenchymateuze leverziekten echter, overeenkomstig de ernst van het proces, nam hij waar, dat de cholesterolsterwaarde verkleind was of dat de esters uit het plasma totaal verdwenen waren. Bij intredende beterschap keerde deze hoeveelheid tot de absolute en relatieve physiologische waarde terug. Volgens dezen onderzoeker heeft de bepaling van het plasmacholesterol, speciaal van de esterhoeveelheid, diagnostische betekenis én, indien de bepaling herhaaldelijk uitgevoerd wordt, prognostische waarde.

Uit een ander onderzoek van EPSTEIN⁴⁶⁾ blijkt, dat bij obstructie icterus, bij vermeerdering van het totale cholesterolgehalte, soms daling van de hoeveelheid esters in het plasma waargenomen wordt; EPSTEIN⁴⁷⁾ verklaart het tot op zekere hoogte eens te zijn met de verklaring, die BÜRGER voor de Estersturz aangeeft.

Bij stoornis van het bekende quotient staan „het cholesterol niet meer voldoende vetzuren ter beschikking; hierdoor komt het in de lever b.v. tot een sterke ophoping van vrij cholesterol en tot een daling van het veresterd cholesterol.”

EPSTEIN en LANDE⁴⁸⁾ geven enige opmerkingen over de physiologie van het cholesterol, die, alhoewel van andere datum, van grote betekenis in dit verband zijn.

„It (het cholesterol) is subject to marked fluctuations under a variety of conditions. In some it appears to be independent of external causes and definitely associated with metabolic disturbances as in diabetes, nephritis etc. There also can be no doubt of the relation of the blood cholesterol to the glands of internal secretion particularly the suprarenal cortex and the thyroid.”

Het onderzochte materiaal, menen zij, laat zien, dat de betrekking, bestaande tussen de stofwisseling en het bloedcholesterol bij ziekten van de schildklier, niet slechts een toevallige is.

De gevonden lage cholesterolwaarden met een verhoogde basale stofwisseling, en de hoge waarden met een verlaagde, leiden tot de verklaring, dat de beschikbare hoeveelheid lipoid bij de verbrandingsprocessen een grote rol speelt.

MARINE en BAUMANN⁴⁹⁾ toonden aan, dat een verhoging van de stofwisseling bij konijnen een gevolg kan zijn van de degeneratie van de bijnierschors; deze waarneming is bijzonder suggestief als men weet, dat er een nauwe verwantschap bestaat tussen de bijnierschors en het bloedcholesterol.

EPSTEIN en LANDE menen hieruit te kunnen concluderen, dat de bijnierschors een belemmerende werking kan uitoefenen op het verloop van de stofwisseling; dit vermogen zou inherent kunnen zijn met de aanwezige lipoidhoeveelheid (o.a. cholesterol) in de bijnierschors, waarvan bekend is dat zij varieert met die van het bloed. In de ziekte van ADDISON is b.v. het bloedcholesterolgehalte zeer laag.

Overzicht:

Lange tijd heeft men in de kliniek de grootste waarde gehecht aan de bepaling van de *totale* hoeveelheid cholesterol in bloedserum van patienten, die aan verschillende ziekten leden; eerst later is men enige betekenis gaan toekennen aan de differentiële bepaling van de vrije- en veresterde fractie.

Het is vooral aan het onderzoek van THANNHAUSER en zijn interpretatie van de waargenomen verschijnselen te danken,

dat tegenwoordig aan de esterhoeveelheid grotere aandacht wordt gewijd. Zijn theorie over de z.g.n. Estersturz in vele gevallen van leverziekten, bijzonder in menig geval van levercirrhose, waarbij hij aan de aanwezigheid van cholesterol-estersplitsende en cholesterolestervormende fermenten in de lever een grote rol toekent, heeft menig aanhanger gevonden. Dit feit is m.i. ten dele te wijten aan de omstandigheid, dat het aanlokkelijk is bij esters te spreken van fermenten, die een hydrolytische werking kunnen uitoefenen, een opvatting, die zo volledig aansluit bij de eigenschappen, die alle esters gemeen hebben. Anderzijds is de theorie van THANNHAUSER en SCHABER ook in overeenstemming met andere biologische feiten en waarnemingen, omdat deze fermenten werkelijk aanwezig en werkzaam zijn in verschillende sereuze media.

Of echter de lever alleen verantwoordelijk is voor de regeling van het bekende quotient (STERN, SUCHANTKE, EPSTEIN en LANDE) zou men kunnen betwijfelen.

Volkomen in tegenspraak met THANNHAUSER's opvatting is de mening van BÜRGER; hij wil de sterke vermindering van de esterhoeveelheid in vele gevallen van levercirrhose o.a. verklaard zien door het feit, dat in deze ziekten een sterke storing van de resorptie der vetten in de darm optreedt, waardoor voor de vorming van cholesterolesters niet voldoende vetzuren beschikbaar zouden zijn.

Er werden onderzoeken verricht naar de juistheid van deze opvatting, welke proeven echter in vele gevallen deze verklaring als niet steekhoudend karakteriseerden; bij een deel van de patienten van THANNHAUSER met Estersturz bestond geen icterus en geen storing in de vertering der vetten.

De verklaring, die THANNHAUSER en SCHABER voor de Estersturz geven, komt mij in gevallen, waarbij zij bij leverziekten wordt waargenomen, als de meest principiële en de meest algemene voor.

Uit het besprokene blijkt ten duidelijkste, dat voor het stellen van de diagnose van levercirrhose de bepaling van het percentage cholesterolesters in serum en een eventueel aantreffen van Estersturz absoluut geen zekere maatstaf is. Estersturz wordt niet alleen bij deze ziekten aangetroffen, terwijl daarenboven gevallen van levercirrhose, zij het bij

verschillende onderzoekers, bekend zijn zonder sterke verlaging van de hoeveelheid dezer esters in het serum.

Voor een klein deel kan dit wel te wijten zijn aan de gevolgde methodiek bij de analyse; de uitbreiding van de ziekte, het stadium, waarin de analyse werd verricht, de variatie, het type van de cirrhose zullen alle van invloed zijn op de gevonden hoeveelheid esters.

LITERATUUR

- 1) J. GARDNER en H. GAINSBOROUGH. „Studies on the cholesterolcontent of normal human plasma” I en II. *Bioch. Journ.* 21-130-1928.
J. GARDNER en H. GAINSBOROUGH. „Studies on the cholesterolcontent of normal human plasma” III. *Bioch. Journ.* 22-1048-1928.
- 2) PETERS en VAN SLYKE. „Quantitative clinical Chemistry”.
- 3) A. BLOCH. „Metabolism, Endocrine Glands and Skindiseases with special reference to Acne vulgaris and Xanthomata”. *Brit. J. of Dermat.* 43-61.
- 4) H. SCHAAF. „Der Lipoidstoffwechsel”. *Zentrbl. Haut. u. Geschl. Krank.* 35-193.
- 5) M. POLANO. Dissertatie. Leiden 1934.
- 6) M. BÜRGER en H. HABS. „Der Cholesterinhaushalt beim Menschen”. *Erg. inn. Med.* 34-583-1928.
- 7) W. BLOOR en A. KNUDSON. „Relationship between cholesterol and cholesterolsters in the blood during fat absorption”. *J. biol. Chem.* 29-7-1921.
- 8) ROSEN en KRASNOW. „Bloodcholesterol findings in Syphilis and other Skindiseases”. *Arch. Derm. a. Syph.* 13-506-1934.
- 9) S. THANNHAUSER. „Über den Cholesterinstoffwechsel”. *Dtsch. Arch. klin. Med.* 141-290-1923.
- 10) E. EPSTEIN. „The cholesterol partition of the blood plasma in parenchymatous disease of the liver”. *Arch. int. Med.* 47-82-1931.
- 11) W. DENIS. „Cholesterol in human blood in pathological conditions”. *J. biol. Chem.* 29-93-1917.
- 12) S. BRANDES. „Cholesterinbepalingen in de kliniek”. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 7-650-1926.
- 13) A. KOZES. „Über den Cholesteringehalt des Blutes bei verschiedenen Krankheiten, insbesondere bei Leberkrankheiten”. Dissertatie. Leipzig.
- 14) S. THANNHAUSER en H. SCHABER. „Über die Beziehungen des Gleichgewichtes Cholesterin und Cholesterinester im Blut und Serum zur Leberfunktion”. *Klin. Woch.* 7-252-1926.
- 15) H. STRAUZ en W. SCHUBARDT. *Zentrbl. inn. Med.* 43-425-1922.
- 16) S. THANNHAUSER. „Über den Cholesterinstoffwechsel”. *Dtsch. Arch. klin. Med.* 141-290-1923.
- 17) M. BÜRGER en H. HABS. „Die alimentäre Hypercholesterinaemie beim stoffwechselgesunden Menschen”. *Zschr. ges. exp. Med.* 56-640-1927.

- 18) M. BÜRGER en H. HABS. „Über Störungen der Fettresorption bei Lebercirrhosen". *Klin. Woch.* 45-2125-1927.
- 19) M. BÜRGER en H. BEUMER. *Klin. Woch.* 50-112-1913.
- 20) J. FEIGL. *Bioch. Zschr.* 90-1-1918.
- 21) W. STEPP. „Über den Cholesteringehalt des Blutserums bei Krankheiten". *Münch. med. Woch.* 29-781-1918.
H. BEUMER. „Über Cholesterinbilanz und Cholesterinansatz". *Zschr. ges. exp. Med.* 35-328-1923.
- 22) M. BÜRGER en W. WINTERSEEL. „Über Störungen der Fett- und Cholesterinresorption und das Schicksal des Cholesterins im Darmkanal bei Kranken mit Lebercirrhose". *Zschr. exp. Med.* 66-463-1929.
- 23) M. BÜRGER en H. HABS. „Über die Veresterung des Serumcholesterins bei Leberkrankheiten". *Klin. Woch.* 47-2221-1927.
- 24) M. BÜRGER. „Das Cholesterinproblem in der inneren Medizin" *Verh. dtsch. Ges. inn. Med.* 186-1931.
- 25) M. BÜRGER. „Der Cholesterinhaushalt beim Menschen". *Erg. inn. Med.* 34-583-1928.
- 26) P. BARREDA. „Über den diagnostischen Wert von Blutcholesterinbestimmungen nach peroralen Cholesterinbelastung". *Klin. Woch.* 13-290-1934.
- 27) I. SNAPPER. *Mdschr. Kinderger.* 2-1933.
- 28) J. GARDNER. „Cholesterol metabolism in disease". *Brit. med. Journ.* 37-392-1932.
- 29) H. ARNDT. „Nahrungs-, Blut- und Gallencholesterin". *Klin. Woch.* 5-1372-1926.
- 30) H. LUBINSKI en R. STERN. „Über die klinische Bedeutung des Cholesterins in der Galle und im Blutserum". *Arch. exp. Path. u. Pharmak.* 114-1-1926.
- 31) H. ARNDT en E. MÜLLER. „Zur Kenntnis des Cholesterinstoffwechsels". *Zschr. ges. exp. Med.* 54-391-1927.
- 32) J. GARDNER en H. GAINSBOROUGH. „Bloodcholesterol studies in biliary and hepatic disease". *Quart. Journ. Med.* 23-465-1930.
J. GARDNER. „Cholesterol metabolism". *Journ. laryng. u. otol.* 47-395-1932.
- 33) R. STERN en G. SUCHANTKE. „Das Gleichgewicht von Cholesterin und Cholesterinester im Blutserum bei gestörter Leberfunktion". *Arch. exp. Path. u. Pharmak.* 115-221-1926.
- 34) A. ADLER en L. SCHIFF. „Einige Beobachtungen über die Wirkung der Leberdiät besonders auf das Blutcholesterin". *Dtsch. Arch. klin. Med.* 161-282-1928.
- 35) A. ADLER en H. LEMMEL. „Cholesterin und Cholesterinester im Blute Leberkranken". *Dtsch. Arch. klin. med.* 158-173-1928.
- 36) M. TAKUWA. „Über den Zusammenhang des Cholesterins mit den Cholesterinestern im Blute des Leberkranken". *Kyoto Ihadaigaka Zasshi.* 2-55-1928.
- 37) A. ANDRES. „Einfluss der Glukose auf die Esterifikation der Leber". *Bratislav. lek Listy* 9-1928.

- 38) M. PETRYNOWSKI. „Sur les rapports mutuels de la cholestérol libre et combinée dans le sérum du sang humain, surtout chez les ictériques”. *Sang* 2-321-1928.
- 39) H. WENDT. „Über das Verhalten der Cholesterinester im Blutserum Leberkranken”. *Klin. Woch.* 1-1215-1929.
- 40) R. MANCKE. „Das Cholesterin des Blutserums bei Leberkrankheiten”. *Dtsch. Arch. klin. Med.* 170-358-1931.
- 41) F. STROEBE. „Zur Cholesterinaemie bei Lebercirrhose und hepatocelluläre Ikterus”. *Klin. Woch.* 1-636-1932.
- 42) H. HEINLEIN. „Die Rolle der Leber im Cholesterin- und Phosphatidstoffwechsel”. *Klin. Woch.* 2-1513-1933.
H. HEINLEIN. *Zschr. exp. Med.* 91-638-1933.
- 43) G. LAROCHE, A. GRIGAUT en COSTES. „Les variations du rapport des esters du cholestérol au cholestérol total en pathologie”. *Presse méd.* 73-1417-1934.
- 44) A. DE MORAIS SARMENTO en M. DA COSTA. „Le rapport entre le cholestérol et ses esters dans les affections hépatiques”. *C.r. Soc. biol.* 115-449-1934.
- 45) E. EPSTEIN. „The cholesterol partition of the blood plasma in parenchymatous disease of the liver”. *Arch. int. Med.* 47-82-1931.
- 46) E. EPSTEIN. „Cholesterol of the blood plasma in hepatic and biliary diseases”. *Arch. int. Med.* 50-203-1932.
- 47) E. EPSTEIN. „Ein Beitrag zur Kenntnis der physiologischen Funktion der Leber als Regulator des Cholesterin Stoffwechsels”. *Klin. Woch.* 1-56-1933.
- 48) A. EPSTEIN en H. LANDE. „Studies on blood lipoids”; „The relation of cholesterol and protein deficiency to basal metabolism”. *Arch. int. Med.* 30-563-1922.
A. EPSTEIN. *Am. J. med. Sci.* 163-167-1922, 154-638-1917.
A. EPSTEIN. *J. Am. Med. Ass.* 11-444-1917.
- 49) D. MARINE en E. BAUMANN. „Influence of glands with internal secretion on the respiratory exchange”. *Am. J. of Physiol.* 57-135-1921.
- 50) T. GEBHARDT. „Cholesterin und cholesterinester bei Erkrankungen der Leber”. *Dtsch. Ges. inn. Med.* 215-1931.
- 51) A. HYMANS v. D. BERGH. „Het cholesterinevraagstuk”. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 956-1932.
- 52) A. ELMER en M. SCHEPS. „Die Cholesterin Fettprobe bei Lebercirrhose”. *Klin. Woch.* 23-7.
- 53) L. WACKER en W. HUECK. *Arch. exp. Path. u. Pharmak.* 74-416-1913.
L. WACKER en W. HUECK. *Bioch. Zschr.* 100-88-1919.

HOOFDSTUK II

LOOPT DE REACTIE VAN TAKATA-ARA PARALLEL MET HET VERSCHIJNSEL VAN DE ESTERSTURZ?

Om bij patienten tot de waarschijnlijke diagnose van levercirrhose te komen, kunnen de z.g.n. leverfunctieproeven goede diensten bewijzen; op de techniek en de uitvoering van deze testproeven ga ik echter op deze plaats niet in.

„Van deze proeven zijn echter slechts relatief bruikbare resultaten te verwachten, daar bij een en dezelfde ziekte iedere op zich zelf staande functie van de lever gestoord kan zijn en daarnaast ook het parenchym in het algemeen in zeer verschillende mate aan beschadiging lijden kan, die dikwijls — en hierbij speciaal aan het cirrhotisch leverproces te denken — vergaand door regeneratieve processen gecompenseerd kan worden.” (EPPINGER)

Zoals nog blijken zal is aan de reactie van Takata grotere waarde voor deze diagnose te hechten.

TAKATA, die deze reactie het eerst beschreef, bezigde ze als een differentiaal-diagnostische methode om in de liquor van zekere patienten en meningitische van een metaluetische ziekte te kunnen onderscheiden¹⁾; bovendien zou zij volgens hem bij croupeuse pneumonie positief zijn en negatief in gevallen van broncho-pneumonie, wanneer zij in serum wordt verricht.

JEZLER²⁾ meent in deze reactie, indien zij eveneens op serum wordt toegepast, een min of meer belangrijk hulpmiddel te zien om bij de diagnose onderscheid te maken tussen levercirrhose en andere ziekten van de lever of van de galwegen.

Alvorens mij nu verder bezig te houden met de doeltreffendheid van deze reactie of met het vermeende resultaat, dat verschillende onderzoekers met de genoemde reactie meenden te bereiken, eerst iets over de techniek van de reactie.

Reagentia:

I - Na-chloride-oplossing	0,9 %.
II - Na-carbonaat	„ 10 %.
III - Mercurichloride	„ 0,5 %.
IV - Fuchsine	„ 0,02 %.

Uitvoering der reactie:

In 8 reageerbuisjes³⁾ brengt men 1 cc oplossing (I) en daarenboven in het 1e buisje 1 cc serum. Meng goed en pipetteer

1 cc van het 1e buisje in het 2e en dan, na menging,

1 cc „ „ 2e „ „ „ 3e

en op dezelfde wijze voortgaande tot aan het 8e buisje.

Tenslotte pipetteert men uit het 8e buisje 1 cc en werpt deze weg.

Het resultaat is een reeks verdunningen van $\frac{1}{2}$ tot $\frac{1}{256}$.

Voeg vervolgens aan ieder buisje toe $\frac{1}{4}$ cc oplossing (II) en $\frac{3}{10}$ cc Takata-reagens, dat telkens vers bereid wordt door gelijke delen van III en IV met elkander te vermengen.

Door de reactie van de soda met de sublimaatoplossing verkrijgt men een colloïdale oplossing van mercuri-oxyde, die bij onvoldoende aanwezigheid van schutcolloïden tot uitvlokking komt.

Beoordeling:

Het aflezen gebeurt terstond, na $\frac{1}{2}$ uur en na 5 uur. Het resultaat wordt aangegeven met:

+++ ++ + of —

al naarmate de uitvlokking terstond, na $\frac{1}{2}$ uur of na 5 uur of in het geheel niet optreedt.

Voor alles is het resultaat van de gehele reeks van belang; de uitslag is positief, wanneer in minstens 3 buisjes uitvlokking (niet te verwarren met troebeling) optreedt en de eerste uitvlokking bij een verdunning van $\frac{1}{32}$ of in een hogere concentratie te zien is.³⁾

Opmerkingen:

- a* - Bij de reactie in serum kan naar een mededeling van VAN GINKEL ⁴⁾ fuchsine worden weggelaten.
- b* - SCHREUDER ³⁾ weegt voor de soda-oplossing watervrij Na-carbonaat af, daar dan de reactie scherper uitvalt, in tegenstelling met VAN GINKEL, die kristalsoda gebruikt.
- c* - De hoeveelheid reagens van Takata moet nauwkeurig gelijk blijven, omdat het resultaat der reactie hiervan in hoge mate afhangt. ³⁾
- d* - Steriliteit is onnodig, wel moet het glaswerk schoon en droog zijn. ³⁾
- e* - De ouderdom van het serum speelt een rol; het verdient aanbeveling het bloed eerst 24 uur in de ijskast te bewaren en dan eerst de reactie te verrichten. ³⁾

Over de verklaring van de Takata-reactie geeft SCHREUDER ³⁾ aan de hand van mededelingen in de literatuur een min of meer kritisch overzicht; een en ander zou ik hier nog gaarne aan toevoegen.

JEZLER ging van de mening uit, dat het mechanisme van de positieve reactie op een verandering in de samenstelling van de eiwitten van het serum zou berusten en dat het bij vermeerdering van de globuline-hoeveelheid tot een uitvlokking van het HgO sol zou komen.

Omdat de lever in de eerste plaats voor de procentuele, zowel als voor de absolute samenstelling van het serumeiwit verantwoordelijk gesteld moet worden, is het dus volgens JEZLER te verwachten, dat bij bepaalde leverziekten een overeenkomstige verschuiving van de eiwitpercentages in het bloed zal plaats vinden, en wel naar de zijde van het globuline.

Uit zijn onderzoekingen en die van anderen blijkt duidelijk het verband, dat er tussen een positieve Takata en een sterke verkleining van het quotient albumine / globuline bestaan kan.

Volgens JEZLER en RÖHRER ⁵⁾ zou de verhouding der beide eiwitten in het serum kleiner geworden zijn in de gevallen, dat uitvlokking optreedt.

SKOUGE en SCHINDEL ⁶⁾ hebben later opgemerkt, dat er pathologische sera zijn met hoger globulinegehalte dan normaal, die echter een negatieve reactie geven.

Een overeenkomstige conclusie als die JEZLER uit zijn onderzoeken trekt, deelt ook SCHREUDER³⁾ in zijn dissertatie mede; hij merkt op, dat de reactie positief uitvalt wanneer:

1e - het globulinegehalte in het serum is verhoogd,

2e - het albuminegehalte excessief verlaagd gevonden wordt.

SCHINDEL⁶⁾ heeft de vraag onder welke omstandigheden de reactie van Takata in serum positief uitvalt, nader in studie genomen; hij deed de opmerkelijke waarneming, dat indien men aan sera met negatieve reactie lagere vetzuren toevoegt, de genoemde reactie positief wordt.

Alhoewel concentraties van vetzuren, zoals SCHINDEL gebruikte, in geen enkel serum voorkomen, is toch in dit verband de waarneming van KALLÓS-DEFFNER⁷⁾ zeer merkwaardig; zij merkte op, dat de reactie van Takata bij konijnen positief wordt bij abnormale stofwisseling van de ketonverbindingen, waar lagere vetzuren een rol van betekenis spelen.

UCKO⁸⁾ en JEZLER⁹⁾ bestrijden de veronderstelling van SCHINDEL, die ook geen bewijs voor het gestelde mag heten.

SCHREUDER³⁾ meent, dat door toevoegen van vetzuren aan serum de PH hiervan zo veranderd wordt, dat aan het uitvallen der reactie geen waarde meer te hechten is.

GROS¹⁰⁾ vermeldt, dat hij sera met positieve Takata-reactie 20-30 uur met chloroform extraheerde en dat daarna de reactie toch nog gelijkelijk positief gebleven was. Lagere vetzuren zouden dus geen rol spelen.

Worden echter door deze chloroform-extractie niet allerlei lipoïdevenwichten in het serum verstoord en kan het positief blijven uitvallen van de reactie niet aan een gelukkige combinatie van tegengestelde oorzaken te wijten zijn?

Alleen door vetzuurbepalingen in sera met positieve of negatieve reactie kan m.i. uitgemaakt worden of deze zuren invloed uitoefenen op de reactie van Takata.

Dit na te gaan lijkt mij de moeite van een onderzoek waard, temeer als men het resultaat van de volgende proef beziet: Aan een serum met negatieve Takata voegde ik een kleine hoeveelheid van een buffermengsel toe; dit had een $P_H = 6,25$ en was bereid uit oplossingen van azijnzuur en Na-acetaat.

Bij bepaling van de reactie in dit aldus verdunde serum bleek, dat zij nu positief geworden was; of dus vetzuren, speciaal dan lagere vetzuren, in deze reactie in het geheel geen rol spelen, lijkt mij in verband met de uitslag van de boven beschreven proef nog dubieus.

In aansluiting hiermede werd door mij in twee gevallen van levercirrhose geconstateerd, dat, indien de Takata-reactie positief is, men te doen heeft met een aanmerkelijke daling der cholesterol-esters in bloedserum; is de reactie negatief dan treft men een normale hoeveelheid esters in het serum aan. Indien in de gevallen van levercirrhose met Estersturz aangetoond zou kunnen worden, dat de hoeveelheid vetzuur in serum verhoogd is, dan zou dit, indien de Takata-reactie positief uitvalt, een steun zijn voor de theorie van SCHINDEL, die bij deze reactie aan de vetzuren een veelbetekenende rol wil toekennen. (tabel XXIV)

Positieve Takata-reacties worden echter ook gevonden in gevallen, waarin het cholesterolsterpercentage van het serum normaal is (tabel XXV); waarschijnlijk is het dus niet, dat Takata-reactie en vetzuurhoeveelheid in het serum in enige relatie met elkander zullen staan.

OEFELEIN ¹¹⁾ geeft van de reactie van Takata een nieuwe verklaring; de ene groep van onderzoekers meent verband te zien tussen een positieve reactie en een verhoogd globuline-resp. verlaagd albuminegehalte van het serum, terwijl anderen, zoals KNIGGS, RÖHRS en KOHL-EGGER de verklaring zoeken in de verandering van de waterstofionenconcentratie en het zoutgehalte van het serum. Met de eerste factor loopt de verklaringswijze van SCHINDEL parallel.

Uit door OEFELEIN verrichte proeven kwam als resultaat te voorschijn, dat „bij de positieve reactie van Takata-Ara het ammonium-ion een belangrijke rol speelt.”

Hij heeft in een groot aantal gevallen nagegaan of er een parallellisme bestond tussen de hoogte van de ammoniakspiegel in het serum (gepreformeerd ammoniak) en het positief uitvallen der reactie. Het bleek OEFELEIN, dat in alle gevallen van een positieve Takata de hoeveelheid ammoniak in het serum sterk verhoogd was; dat er zelfs in de regel een bepaalde evenredigheid bestond tussen deze twee grootheden.

Tot zover over de pogingen, die tot een verklaring van de Takata-reactie ondernomen werden; uitsluitel geven zij geen van alle.

Over de klinische waarde der Takata-reactie deelt SCHREUDER³⁾ in zijn dissertatie een en ander mede.

Op de vraag of deze reactie specifiek is voor leveraandoeningen, speciaal voor levercirrhose, moet ontkennend geantwoord worden, „daar zij ook bij patienten met andere ziekten somtijds positief uitvalt.”

„Voor de differentieel diagnostiek der leveraandoeningen, vooral voor de diagnose levercirrhose, kan zij een waardevol hulpmiddel vormen.”

In 16 gevallen van levercirrhose vindt SCHREUDER bij 15 patienten de reactie positief.

SCHINDEL¹²⁾ constateerde bij 13 cirrhoses 12 maal een positieve reactie; in een reeks van 148 gevallen van levercirrhose, door verschillende onderzoekers verzameld, waren 83,8 % gekenmerkt door een positieve reactie.

JEZLER onderzocht 42 gevallen van deze ziekte en vond bij 38 hiervan een positieve reactie; bij alle andere aandoeningen van lever en galwegen, parenchymicterus, obstructie-icterus, tumormetastasen en cholelithiasis viel zij negatief uit.

Bij 18 patienten door RÖHRER¹³⁾ onderzocht, en die een positieve reactie vertoonden, leden er 15 aan levercirrhose; onder 72 gevallen met negatieve reactie trof hij echter 23 maal levercirrhose aan.

VAN GINKEL⁴⁾ vond 16 maal een positieve reactie bij 21 levercirrhoses, terwijl SKOUGE¹⁴⁾ in 30 gevallen met positieve reactie bij sectie 27 maal levercirrhose constateerde.

In een nieuw onderzoek nam JEZLER¹⁵⁾ bij 90 patienten met levercirrhose 74 maal een positieve reactie in het serum waar.

Bovenstaande opsomming van gegevens uit de literatuur is natuurlijk eenzijdig; weliswaar blijkt hieruit, dat de Takata-reactie in de meeste gevallen van levercirrhose positief is, doch een positieve reactie wordt in vele andere ziektegevallen, waarbij van leveraandoeningen geen sprake is, eveneens aangetroffen. Daarenboven werd bij andere leverziekten dan levercirrhose eveneens vaak een positieve reactie geconstateerd,

terwijl er menig geval van cirrhose van de lever bekend is, die een negatieve reactie in het serum gaf.

Alhoewel men evenals SCHREUDER in de Takata-reactie een goed hulpmiddel mag zien voor het vaststellen van de levercirrhose-diagnose, zou ik toch voorzichtiger willen zijn dan SCHINDEL, die deze reactie als een „Charakteristicum der Lebercirrhose” betitelt en die meent, dat een positieve reactie „ein Schwund des Leberparenchyms” aantoonst, dus een morphologische toestandsverandering indiceert.

OEFELEIN deelt de opvatting van SCHINDEL en vat evenzo de Takata-reactie als een specifieke indicator voor de aanwezigheid van een parenchymbeschadiging op.

In het voorgaande hoofdstuk heb ik nagegaan of het optreden van Estersturz in het serum specifiek is voor levercirrhose; dit bleek niet het geval te zijn.

Uit het bovenstaande moet men concluderen, dat een positieve Takata-reactie geen zekerheid geeft of een patient lijdende is aan levercirrhose; naar bevindingen in de kliniek van Prof. SNAPPER is een positieve reactie voor levercirrhose niet méér specifiek dan dat globulineverhoging hiervoor beslissend zou zijn.

TABEL XXIV

No.	Diagnose:	Takata:	Cholesterol		Esterpercentage:
			Totaal:	Ester:	
1	Levercirrhose	pos.	201 mgr %	84 mgr %	42 %
2	idem	pos.	185 „	62 „	33 %
3	Veel verbeterde levercirrhose	neg.	197 „	111 „	56 %
4	Luet. levercirrhose	pos.	188 „	128 „	68 %
5	Morbus Banti	pos.	119 „	34 „	28 %

Uit deze enkele gevallen blijkt dat noch Estersturz, noch positieve Takata-reactie beslissende indicatoren zijn in de diagnose voor levercirrhose; opmerkelijk is echter, dat in de gevallen van levercirrhose 1, 2 en 5 zowel Estersturz, of liever aanmerkelijke daling van de cholesterolesters in het serum, als een positieve Takata-reactie geconstateerd werd.

Bij vele andere patienten met levercirrhose vindt men zowel:

a - een positieve Takata-Ara-reactie, als

b - Estersturz.

Het zou dus mogelijk zijn, dat de reactie van Takata niet van de hyperglobulinaemie afhankelijk zou zijn, doch zou samenhangen met de stoornis van het cholesterol / cholesterol-esterevenwicht, die in het serum van patienten met levercirrhose kan bestaan.

Om dit nader uit te maken werd bij een aantal patienten, die niet aan levercirrhose leden, maar wier serum toch een positieve Takata-reactie vertoonde, het gehalte aan vrij cholesterol en zijn esters in het serum bepaald.

De bepaling geschiedde volgens de oxydimetrische methode.

De volgende tabel laat het resultaat van dit onderzoek zien.

TABEL XXV

No.	Diagnose:	Takata:	Cholesterol		Ester- percentage:
			Totaal:	Esters:	
1	Ziekte v. Kahler	pos.	104 mgr %	77 mgr %	74 %
2	Myeloïde leucaemie	pos.	113 „	77 „	68 %
3	Icterus	pos.	299 „	172 „	59 %
4	Ziekte v. Kahler	pos.	96 „	67 „	69 %
5	Myeloïde leucaemie	pos.	124 „	86 „	69 %
6	idem	pos.	121 „	74 „	61 %
7	Icterus catarrhalis	pos.	169 „	111 „	65 %
8	Bronchiaal carc.	pos.	79 „	42 „	53 %
9	Actinomycosis	pos.	103 „	70 „	68 %
10	Ziekte v. Kahler	pos.	148 „	113 „	76 %
11	idem	pos.	171 „	112 „	65 %
12	Lymphogranulose	pos.	163 „	105 „	64 %
13	M. Gaucher	neg.	192 „	121 „	63 %
14	Lymphogranulose	neg.	176 „	105 „	60 %
15	Periton. t.b.c.	neg.	172 „	113 „	65 %

Gelijk te verwachten was — immers deze 12 eerste patienten hadden zeker een normale leverfunctie — werden hier ondanks de sterk positieve reactie van Takata-Ara bijna normale waarden voor de beide cholesterolfracties in het serum gevonden; de totale cholesterolhoeveelheid is n.l. betrekkelijk laag, de esterhoeveelheid ligt binnen normale grenzen.

LITERATUUR

- 1) TAKATA-ARA. „Über eine neue kolloidchemische Liquorreaktion“. Tokio 1926.
- 2) A. JEZLER. „Die Takatasche Kolloid-Reaktion in Serum und Körperflüssigkeiten und ihre Beziehungen zu Störungen des Eiweißstoffwechsels der Leber“. *Zschr. klin. Med.* 114-739-1930.
- 3) J. SCHREUDER. „De reactie van Takata-Ara“. Dissertatie. Amsterdam 1934.
- 4) VAN GINKEL. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 991-1934.
VAN GINKEL. *Ref. Kongr. inn. Med.* 323-1934.
- 5) C. RÖHRER. „Über die Takata-Ara Reaktion (Modification Jezler) bei Leberaffektionen“. *Zschr. klin. Med.* 123-637-1933.
- 6) L. SCHINDEL. „Mechanismus der Reaktion nach Takata-Ara“. *Klin. Woch.* 6-221-1934.
- 7) L. KALLÓS-DEFFNER. „Über Ketonaemie bei Kaninchen“. *Zsch. exp. Med.* 92-394-1933.
- 8) UCKO. *Klin. Woch.* 1-468-1935.
- 9) A. JEZLER. *Münch. med. Woch.* 289-1935.
- 10) W. GROS. „Über die Bedeutung der normalerweise im Serum vorkommenden niederen Fettsäuren für die Takata'sche Reaktion“. *Münch. med. Woch.* 82-1151-1935.
- 11) F. OEFELEIN. „Wirkungsmechanismus der Reaktion nach Takata-Ara und ihre praktische Bedeutung als Leberfunktionsprüfung“. *Klin. Woch.* 2-56-1935.
- 12) L. SCHINDEL en E. BARTH. „Die Bedeutung der Takata Reaktion für die Diagnose der Lebererkrankungen in ihrem Verhältnis zur Galaktose- und Bilirubinbelastung“ (I). *Klin. Woch.* 37-1329-1934.
L. SCHINDEL en E. BARTH. *Klin. Woch.* 38-1355-1934.
- 13) C. RÖHRER. *Zschr. klin. Med.* 41-1933.
- 14) E. SKOUGE. „Der Wert der Takata-Ara Reaktion und der Koagulationsbandbestimmung bei Leberkrankheiten“. *Klin. Woch.* 1-905-1933.
- 15) A. JEZLER. „Erfahrungen mit der modifizierten Takata-Reaktion“. *Klin. Woch.* 1276-1934.

SAMENVATTING

- 1 - Naar gegevens in de literatuur, zowel geput uit waarnemingen bij levercirrhose als bij andere leverziekten of belemmeringen van de leverwerking, zou men wel mogen besluiten, dat leverparenchymbeschadiging dikwijls aanleiding kan geven tot verstoring van het evenwicht vrij / estercholesterol. Uit het feit, dat in serum het percentage der cholesterolesters sterk gedaald is, mag men omgekeerd echter niet tot een zekere diagnose van beschadiging van het leverparenchym concluderen.
- 2 - Uit het onderzoek of de reactie van Takata-Ara parallel loopt met het verschijnsel van de Estersturz, volgt, dat de positieve reactie van Takata, die bij patienten met levercirrhose zo dikwijls gevonden wordt, niet met de stoornis van het cholesterol / cholesterolesterevenwicht in het serum dezer patienten samenhangt.

STELLINGEN

I

Een negatieve loodreactie in urine behoeft geen bewijs te zijn voor de afwezigheid van een loodvergiftiging.

(Arch. f. Gewerb. Path. u. Gewerb. Hyg. Bd. 4 Hft. I)

II

Bij de quantitative bepaling van lood in bloed is de dithizon-methode te verkiezen boven de sulfide-methode.

III

De aanwezigheid van een verhoogd porphyrine-gehalte in urine is de gevoeligste indicatie voor een loodvergiftiging.

(Klin. Woch. 1534-1932)

IV

In de bepaling in urine van vitamine-C, door deze te baseren op het reductievermogen van deze stof, behoeft men nog geen bewijs te zien voor de aanwezigheid van ascorbinezuur.

(Merck's Jahresber. 49-93-1936)

V

De quantitative bepaling van eigeel in eet- en drinkwaren, volgens de gebruikelijke lecithine-phosphorzuur methode, is voor sommige genotmiddelen niet steeds bewijzend.

VI

Elaidinezuur is een trans-verbinding.

(Chem. Weekbl. 1-3-1936)

VII

De reactie van BRÜCKNER voor de bepaling van ergosterol is aan bedenkingen onderhevig.

(Bioch. Zschr. 270-346-1934)

VIII

De additie van digitonine aan neerslagen van cholesterol-digitonide kan de uitkomsten van cholesterolbepalingen foutief doen uitvallen.

IX

Op de Middelbare Scholen behoort, door matiging van de eisen aan parate kennis, meer aandacht besteed te kunnen worden aan een inleidende, scheikundige vorming der leerlingen.

